
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Charité Campus Mitte

Thema: Die Bedeutung von Angiotensin II und "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors" in vaskulären Zellen bei der Entstehung der Atherosklerose

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Experimentelle Pharmakologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Herrn Dr.med.Ulrich Kintscher

geboren am 23. Oktober 1967 in Wuppertal

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. T. Eschenhagen, Hamburg
2. Prof. Dr. V. Hombach, Ulm

Datum der Einreichung: 14.10.2003
Datum der Habilitation: 18.03.2004

1.	Einführung	3
2.	Eigene Arbeiten zu direkten vaskulären Effekten von Angiotensin II und PPARs	5
2.1	Pro-atherosklerotische Wirkungen von Angiotensin II auf vaskuläre/ inflammatorische Zellen	5
2.1.1	Angiotensin II Induziert die Migration von Blutmonozyten.....	5
2.1.2	Regulation der Angiotensin II-vermittelten VSMC-Proliferation.....	7
2.2	Anti-atherosklerotische Effekte von PPARs in vaskulären/ inflammatorischen Zellen	10
2.2.1	PPAR α - und PPAR γ -Liganden hemmen die monozytäre Migration .	10
2.2.2	Regulation der PPAR γ -Expression in Monozyten	13
2.2.3	PPAR γ -Liganden hemmen die Zellzyklusprogression in VSMC	15
2.2.4	PPAR γ -Liganden hemmen die proliferationsfördernde Induktion von p21 ^{Cip1} in VSMC	17
2.2.5	PPAR α -Liganden hemmen die Migration von VSMC	19
2.3	Hemmung der in-vivo Atherogenese durch PPAR-Aktivierung.....	21
2.3.1	Anti-atherosklerotische Effekte von PPAR γ in LDL-R-defizienten Mäusen	21
2.3.2	Hemmung der Angiotensin II-vermittelten Atherogenese durch PPAR γ	23
3.	Zusammenfassung	25
	Literaturverzeichnis	28
	Eidesstattliche Erklärung	33
	Danksagung	34

1. Einführung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt oder die Herzinsuffizienz, stellen eine der häufigsten Todesursachen in industrialisierten Ländern dar. Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen der Koronarien oder peripherer Gefäße sind massgeblich an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt.

Die Entstehung der Atherosklerose oder Atherogenese ist ein chronisch inflammatorischer Prozess beginnend mit einer Schädigung des Gefäßendothels durch multiple kardiovaskuläre Risikofaktoren. [1] Im Rahmen der Endothelschädigung werden vermehrt Adhäsionsmoleküle für Blutmonozyten exprimiert. [2] Hierdurch kommt es nach initialer Adhäsion der Monozyten zur transendothelialen Migration dieser inflammatorischen Zellen in das Subendothelium. [3] Im folgenden kommt es zur Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, welche sich durch die Aufnahme von oxidiertem und azetyliertem LDL-Cholesterin zu sogenannten Schaumzellen entwickeln. [4] Diese Schaumzellen bilden dann zusammen mit extrazellulären Matrixmolekülen einen wesentlichen Bestandteil der frühen atherosklerotischen Läsion oder Plaque. [4] Im weiteren Verlauf kommt es zusätzlich zur Einwanderung von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Gefäßmedia und anschließender Zellproliferation. [5] Die kontinuierliche Abfolge dieser Ereignisse führt dann letztlich zur Einengung des Gefäßlumens.

Die genannten Prozesse während der Atherogenese werden durch eine Reihe von pro- aber auch anti-atherosklerotischen Faktoren reguliert. Ein zentraler pro-atherosklerotischer Wachstumsfaktor ist das vasoaktive Peptidhormon Angiotensin II. [6] Zentrale Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (Angiotensin II, Angiotensin-rezeptoren Typ 1 (AT1-R)/ Typ 2 (AT2-R) und Angiotensin-Converting Enzym (ACE)) sind in humanen atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert. [7, 8, 9] In der HOPE-Studie (The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study) konnte an 9297 Patienten mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockierung des RAS mittels des ACE-Inhibitors Ramipril zur anhaltenden Reduzierung von kardiovaskulären Ereignissen führt. [10] Zusätzlich wurde in verschiedenen Tiermodellen demonstriert, dass ACE-Inhibitoren und AT1-R-Blocker die Entstehung von atherosklerotischen Gefäßwandläsionen abschwächen. [11, 12] Die direkte Infusion von Angiotensin II verstärkt die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen unabhängig von Angiotensin II's blutdrucksteigernden Wirkung. [13] Aus diesem Grunde wurden zusätzliche direkte, pro-atherogene Effekte von Angiotensin II auf vaskuläre Zellen diskutiert. Wir untersuchten direkte pro-atherosklerotische Wirkungen von Angiotensin II auf humane periphere Monozyten und glatte Gefäßmuskelzellen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass Angiotensin II nach Bindung an den AT1-R über Aktivierung spezifischer zytoplasmatischer Signalwege die Migration von Monozyten als direkter Chemotaxisfaktor induziert. [14] Zusätzlich stimuliert Angiotensin II die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und hat somit auch in der späten Phase der Plaqueprogression eine pro-atherogene Wirkung. [15]

Den pro-atherosklerotischen Faktoren in der Gefäßwand stehen eine Reihe von atherosklerose-hemmenden Modulatoren gegenüber. Wichtige Regulatoren von anti-atherogenen Effekten in der Gefäßwand sind eine Gruppe von ligand-aktivierten nukleären Hormonrezeptoren, die Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR). [16] Man unterscheidet zwischen drei PPAR Isoformen: PPAR α , PPAR δ und PPAR γ . [16] In der Gefäßwand sind hauptsächlich PPAR α und PPAR γ exprimiert, wobei die

Expression in Endothelzellen, in glatten Gefäßmuskelzellen und in Monozyten/Makrophagen nachweisbar ist. [16] PPARs werden durch unterschiedliche endogene und exogene Liganden aktiviert. PPAR α Aktivität wird durch Bindung von endogenen Eicosanoiden und durch Fibrate stimuliert, wohingegen PPAR γ durch Prostaglandinderivate und die als Insulinsensitizer in der oralen anti-diabetischen Therapie verwendeten Thiazolidindeone oder Glitazone aktiviert. [17, 18] Nach Ligandenaktivierung kommt es zur Bindung mit dem nukleären Rezeptor RXR α . [19] Anschliessend erfolgt die Bindung des PPAR/ RXR α -Heterodimers an spezifische Promotorregionen (PPAR Response Elemente, PPRE) in Zielgenen. [19] Als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren regulieren PPARs neben metabolischen Prozessen in Leber und Fettgewebe, direkt die vaskuläre Genexpression. Wir konnten sowohl in in-vitro Untersuchungen als auch im Tiermodell nachweisen, dass aktiviertes PPAR α und γ wesentliche atherosklerose-fördernde Prozesse inhibiert und die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen blockiert. [20, 21, 22] Die pharmakologische Aktivierung von PPARs mit Verbesserung des metabolischen Profils und direkten vaskulären Effekten stellt somit einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von atherosklerose-bedingten kardiovaskulären Erkrankungen dar.

Interaktionen zwischen dem pro-atherogenen Angiotensin II und anti-atherogen wirkenden PPARs sind bisher nur unvollständig aufgeklärt. Die Kenntnisse dieser Interaktionen könnte von wichtiger klinischer Bedeutung sein, da ACE-Inhibitoren bzw. AT1R-Antagonisten und PPAR-Liganden häufig zur Behandlung von kardiovaskulären Risikopatienten eingesetzt werden. Hierbei würden synergistische Interaktionen in der Gefässwand von grosser Wichtigkeit sein. So kommt es nach Behandlung mit PPAR γ -Liganden zur Repression des AT1R Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen. [23] Zusätzlich beeinflussen PPAR γ -Liganden die AT1R-vermittelte Signaltransduktion in vaskulären Zellen. [24] Wir konnten zeigen, dass PPAR γ -Liganden durch Blockade des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor Egr-1 in-vivo die Angiotensin II-induzierte Atherosklerose inhibiert. [25] Die weitere Aufklärung der pathophysiologischen Verbindungen von Angiotensin II und PPARs in der Gefässwand kann zur Verbesserung der Spezifität und Effektivität kardioprotektiver pharmakologischer Therapien beitragen.

Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten stellen die Untersuchungsergebnisse zu pro-atherogenen Effekten von Angiotensin II und anti-atherogenen Wirkungen von PPAR-Aktivatoren in vaskulären Zellen vor und beschreiben Interaktionen der beiden Systeme in der Gefässwand.

2. Eigene Arbeiten zu direkten vaskulären Effekten von Angiotensin II und PPARs

2.1 *Pro-atherosklerotische Wirkungen von Angiotensin II auf vaskuläre/inflammatorische Zellen*

2.1.1 *Angiotensin II Induziert die Migration von Blutmonozyten*

Angiotensin II ist ein wichtiger vasokonstriktorischer Wachstumsfaktor und spielt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation und in der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Salz- und Wasserhaushaltes. [26] Zusätzlich konnten kürzlich direkte, blutdruckunabhängige Effekte von Angiotensin II in der Gefäßwand nachgewiesen werden. Die Infusion von Angiotensin II in Apolipoprotein E-defiziente Mäuse führte zu einer massiven Verstärkung der Entstehung atherosklerotischer Plaques. [13] Die verwendete Angiotensin II Dosis hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck der Tiere, so dass von einem direkten Effekt auf die Gefäßwand auszugehen ist. Parallel konnte in mehreren Studien eine pro-inflammatorische Wirkung von Angiotensin II in der Gefäßwand beobachtet werden und es wird spekuliert, dass Angiotensin II über die Stimulation der vaskulären Inflammation die Entstehung der Atherosklerose fördert. Bisherige Studien konzentrierten sich überwiegend auf pro-inflammatorische Effekte von Angiotensin II in vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). In Endothelzellen stimuliert Angiotensin II die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)), was zu einer verstärkten Anheftung von Leukozyten an die Gefäßwand führt. [27, 28, 29] In VSMC induziert Angiotensin II das Chemokine „Monocyte Chemoattractant Protein 1“ (MCP-1), ein weiterer wichtiger pro-inflammatorischer Faktor in der Gefäßwand. [30] In neuen Studien wurden der AT1-R und der AT2-R ebenfalls auf Monozyten identifiziert. [31] Es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II in Monozyten die Abgabe proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumor necrosis factor α stimuliert, was zur Atherogenese beitragen könnte. [32, 33] Zusätzlich wird die Aufnahme von proatherogenem, oxidiertem LDL und dessen weitere oxidative Modifikation in Makrophagen durch Angiotensin II induziert. [34] Angiotensin II-vermittelte Effekte auf Monozyten scheinen wesentlich an der pro-atherogenen Wirkung von Angiotensin II beteiligt zu sein.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Angiotensin II eine direkte chemotaktische Wirkung auf Blutmonozyten hat. [14] Angiotensin II induzierte die Migration von primären humanen Blutmonozyten und von monozytären THP-1 Zellen über eine extrazelluläre Matrixbarriere im modifizierten Boydenkammer-Migrationsassay (Abbildung 1A). Die promigratorische Wirkung von Angiotensin II stellt einen weiteren Mechanismus dar, durch den die atherosklerose-fördernde Wirkung dieses Peptides erklärt werden kann. Zusätzlich untersuchten wir die durch Angiotensin II aktivierten Signaltransduktionswege in primären Monozyten und THP-1 Zellen. Nach Blockade des AT1-R mit dem selektiven AT1-R Antagonisten Losartan wurde die Angiotensin II-induzierte Migration der Zellen dosisabhängig inhibiert, wobei die Blockade des AT2-R mittels PD123319 keinen Effekt hat (Abbildung 1B). Im weiteren identifizierten wir mit Hilfe von selektiven pharmakologischen Inhibitoren c-Src, p38-Kinase und die mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 als Angiotensin II-abhängige, pro-migratorische Signalwege in Monozyten.

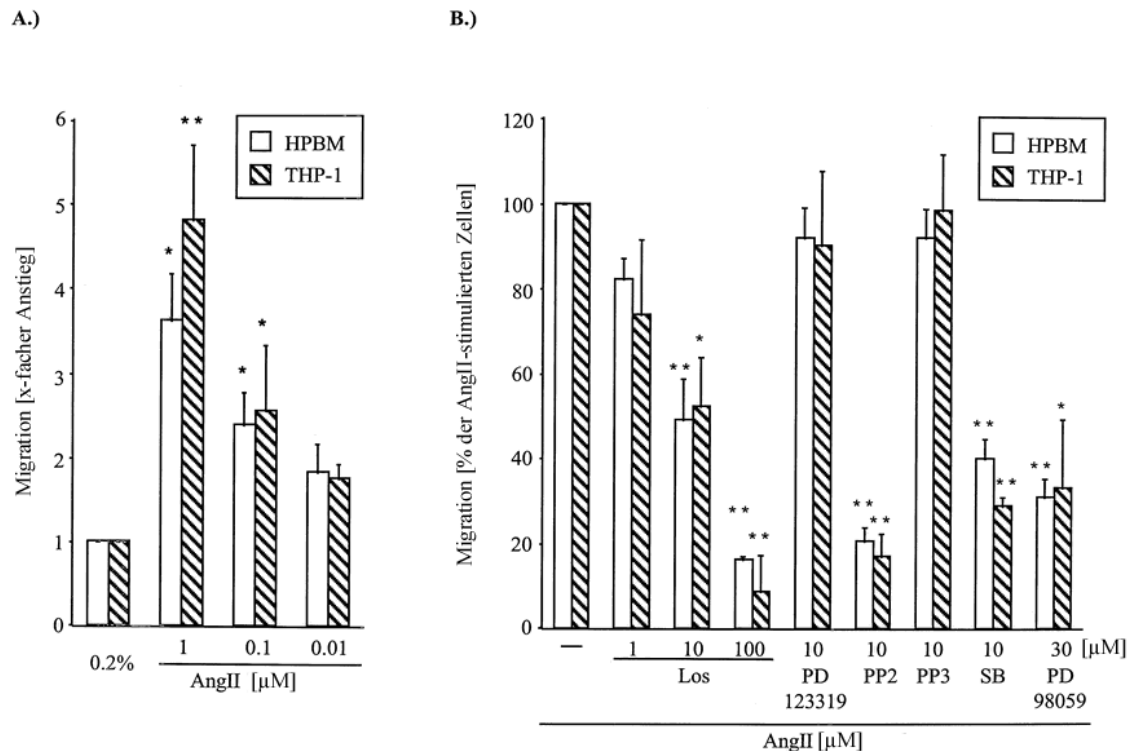


Abbildung 1: A.) Angiotensin II induziert die Migration von humanen Monozyten. Die Migration von humanen peripheren Blutmonozyten (HPBM) und humanen THP-1 Monozyten (THP-1) wurde durch die Hinzugabe von Angiotensin II (0.01 - 1 $\mu\text{mol/L}$) in das untere Kompartiment einer modifizierten Boydenkammer induziert. Die Migration der Zellen ist als x-facher Anstieg über die Migration unbehandelter Zellen dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ versus unbehandelte Zellen. B.) HPBM und THP-1 Zellen wurden mit dem AT1-R Antagonisten Losartan, AT2-R Antagonisten PD123319, mit dem Src-Inhibitor PP2 (inaktives Analogon PP3), mit dem p38-Kinase Inhibitor SB203580 und mit dem MEK-Inhibitor PD98059 vorbehandelt und im Anschluss mit Angiotensin II stimuliert. Die Migration der Zellen ist als prozentualer Anteil der Migration Angiotensin II-stimulierter Zellen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ präsentiert.

Zellbewegung erfordert die kontinuierliche Umstrukturierung des Zytoskelettes. Dies beinhaltet die Phosphorylierung von zytoskelett-assoziierten Tyrosinkinasen und die Formierung von fokalen Adhäsionskomplexen. Die Prolin-reiche Tyrosinkinase (Pyk2) und Paxillin sind zwei zytoskelett-assoziierte Proteine, deren Phosphorylierung und Aktivierung für die Zellmigration erforderlich ist.

Zur Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen der pro-migratorischen Wirkung von Angiotensin II in Monozyten, untersuchten wir die Phosphorylierung von Pyk2 und Paxillin nach Angiotensin II Stimulation. Angiotensin II induzierte die Phosphorylierung von Pyk2 mit einem Maximum nach 10min und 1 $\mu\text{mol/L}$ (Abbildung 2A). Parallel wurde nach 2min Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/L}$) Paxillin phosphoryliert (Abbildung 2B). Um die zytoplasmatischen Signaltransduktionswege der Angiotensin II-induzierten Pyk2- und Paxillin-Phosphorylierung weiter zu charakterisieren wurden die Zellen mit verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Wir konnten zeigen, dass beide Zytoskelett-assoziierten Proteine über den AT1-R phosphoryliert werden, da Losartan die Angiotensin II-vermittelte Induktion von Pyk2 und Paxillin nahezu vollständig blockiert (Abbildung 2A und 2B). Zusätzlich ist die Aktivierung von c-Src für die Phosphorylierung von Pyk2 und Paxillin erforderlich, da ebenfalls der Src-Inhibitor PP2 die Angiotensin II Stimulation komplett blockierte (Abbildung 2A und 2B). Die Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 hatten keinen Effekt, so dass diese beiden Signaltransduktionswege „downstream“ von Pyk2 und Paxillin aktiviert werden.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie eine neue pro-atherogene Wirkung von Angiotensin II identifizieren. Angiotensin II stimuliert via AT1-R Aktivierung direkt die Migration von Monozyten, was mit der Phosphorylierung zweier zentraler Zytoskelett-assoziierten Proteine verbunden ist. Zusätzlich ist die Aktivierung der zytoplasmatischen Signaltransduktionswege: c-Src, p38-Kinase und ERK1/2 für die pro-migratorische Wirkung von Angiotensin II in Monozyten erforderlich.

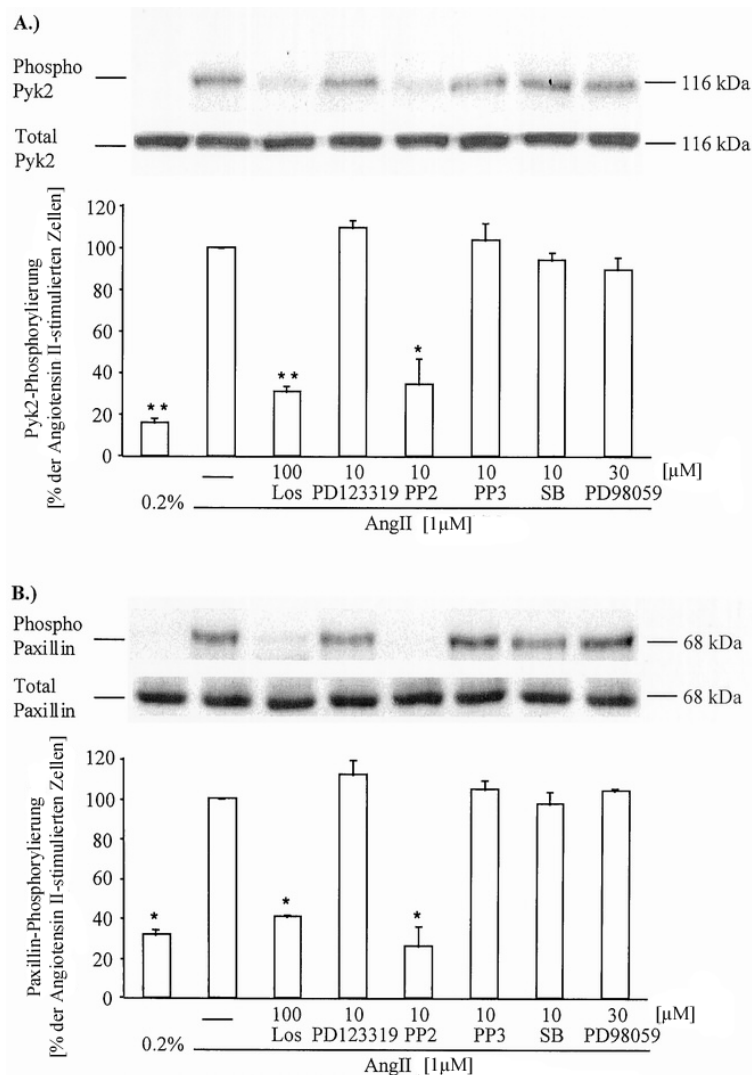


Abbildung 2: Die Angiotensin II - induzierte Phosphorylierung von Pyk2 und Paxillin ist AT1-R und Src-Kinase abhängig. Humane THP-1 Monozyten wurden mit dem AT1-R-Antagonist Losartan (LOS), dem AT2-R-Antagonist PD123319, dem Src-Kinase Inhibitor PP2, einem inaktiven Analogon PP3, dem p38-Kinase Inhibitor SB203580 und dem ERK 1/2-Kinase Inhibitor PD98059 für 30min präinkubiert und dann mit Angiotensin II behandelt. Nach 10min (Pyk2) (A.) und 2min (Paxillin) (B.) wurden Proteine extrahiert und mittels Western Immunblotting analysiert. Die phosphorylierte Form von Pyk2 und Paxillin wurden mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper (obere Banden) analysiert. Die Angiotensin II-induzierte Phosphorylierung konnte bei beiden Proteinen durch Losartan und PP2 inhibiert werden. Parallel wurde die Gesamtexpression der Proteine untersucht (untere Banden). Die densitometrischen Daten sind prozentual zu den Angiotensin II-stimulierten Zellen angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ präsentiert.

2.1.2 Regulation der Angiotensin II-vermittelten VSMC-Proliferation

Die Proliferation von VSMC ist ein zentraler proatherosklerotischer Prozess während der späten Phasen der Plaqueentstehung. [5] In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Hyperplasie von VSMC induziert. [35] Diese proliferationsfördernde Wirkung von Angiotensin II erfordert das Vorhandensein anderer

Wachstumsfaktoren, wohingegen in deren Abwesenheit Angiotensin II lediglich die Hypertrophie dieser Zellen stimuliert. Diese unterschiedlichen Antworten von VSMC auf Angiotensin II werden nach Aktivierung zytoplasmatischer Signaltransduktionswege auf der Ebene des mitotischen Zellzyklus reguliert.

Zellproliferation erfordert zunächst den Übertritt der ruhenden Zelle von der sogenannten G0/G1-Phase des Zellzyklus in die DNA-Synthese Phase (S-Phase). [36] Die Progression durch die G0/G1-Phase zur S-Phase wird koordiniert durch die Expression und Aktivierung von multiplen Holoenzymen, welche aus einer Cyclineinheit und einer katalytischen cyclinabhängigen Kinase bestehen. [37] Das Cyclin D1 konnte als zentrales G1-Phase Cyclin identifiziert werden. Holoenzyme phosphorylieren das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (Rb), was zur Inaktivierung von Rb und zur Freisetzung des gebundenen Transkriptionsfaktors E2F führt. [38] E2F stimuliert dann die Transkription von Genen, welche Proteine kodieren, die für den Übertritt in die S-Phase erforderlich sind. [39] Von der S-Phase tritt die Zelle dann in die Mitose-Phase (G2/M-Phase) ein, die in der Zellteilung und Zellproliferation endet. [36] Kommt es zur Blockade einzelner Schritte dieses Zyklus so kann eine Hypertrophieantwort resultieren. Die Expression und Aktivierung der G1-Phase Moleküle wird durch zytoplasmatische MAP-Kinasen reguliert. [40]

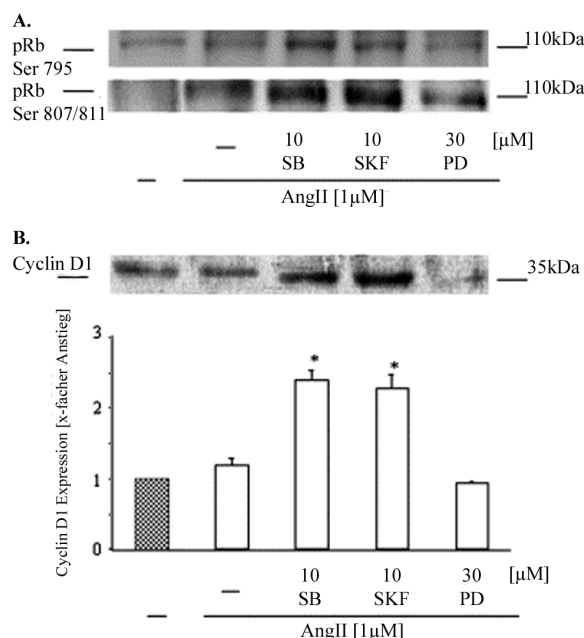


Abbildung 3: Die Angiotensin II-induzierte Rb-Phosphorylierung und Cyclin D1 Expression werden durch die p38 Kinase negativ reguliert. Humane koronare VSMC wurden mit Angiotensin II (1 µM) ± p38 Kinase Inhibitoren SB203580 (SB, 10 µM) und SKF-86002 (SKF, 10 µM), und dem MEK-Inhibitor PD98059 (PD, 30 µM) stimuliert. A.) Nach 24h wurde mittels Western Immunoblotting unter Verwendung von phospho-spezifischen Antikörpern der Rb-Phosphorylierungsstatus an zwei verschiedenen Phosphorylierungsstellen (Ser795 und Ser807/811) ermittelt. Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen Experimenten. B.) Nach 24h wurde die Proteinexpression von Cyclin D1 analysiert. Ein repräsentativer Immunoblot und die densitometrische Analyse von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die densitometrischen Ergebnisse sind als x-facher Anstieg über die Expressionlevel von unstimulierten Zellen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM, * P < 0.05 vs. unstimulierte VSMC präsentiert.

Um die genauen Mechanismen der Angiotensin II-vermittelten VSMC Proliferation/Hypertrophie aufzuklären, untersuchten wir in humanen koronaren VSMC die Wirkung von Angiotensin II auf die Expression und Phosphorylierung zentraler Zellzyklusmoleküle. [15] Hierbei wurde die Bedeutung der Angiotensin II-stimulierten MAP-Kinasen, p38 und ERK1/2, analysiert. Wir konnten zeigen, dass die Blockade der p38-Kinase mittels unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren (SB203580 und SKF-86002) zur massiven Verstärkung der Angiotensin II-stimulierten Rb-Phosphorylierung führt (Abbildung 3A) Dies identifiziert die p38-Kinase als negativen Regulator Angiotensin II-

vermittelter Zellzykluseffekte. Die Blockade von ERK1/2 durch PD98059 hatte keinen Effekt. Die negative Regulation von Rb durch p38 scheint durch Suppression der Cyclin D1-Expression bedingt zu sein, da es unter p38-Kinaseblockade ebenfalls zu einer Verstärkung der Cyclin D1-Expression in VSMC kommt (Abbildung 3B).

Abschliessend untersuchten wir mittels BrdU-Inkorporation, ob die negative Regulation von Rb und Cyclin D1 durch die p38 Kinase in einer Suppression der Angiotensin II-induzierten DNA-Synthese resultiert. Übereinstimmend mit den Wirkungen auf die Zellzyklusmoleküle führte die Blockade des p38-Kinase Signalweges zur Verstärkung der Angiotensin II-induzierten DNA-Synthese (Abbildung 4). Zusammenfassend konnten wir somit in diesen Untersuchungen die p38-Kinase als negativen Regulator der Angiotensin II-stimulierten DNA-Synthese indentifizieren. Bei Blockade dieses Signalweges kommt es zu einer Verstärkung der proliferationsfördernden Angiotensin II Effekte. Da es in Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren zur Blockade der p38-Kinaseaktivität kommen kann, könnte dieser Mechanismus eine Erklärung für die unterschiedlichen Antworten von VSMC auf Angiotensin II sein. [41] Diese Mechanismen stellen eine wichtige pro-atherosklerotische Interaktion von Angiotensin II mit anderen Wachstumsfaktoren in der Gefässwand dar.

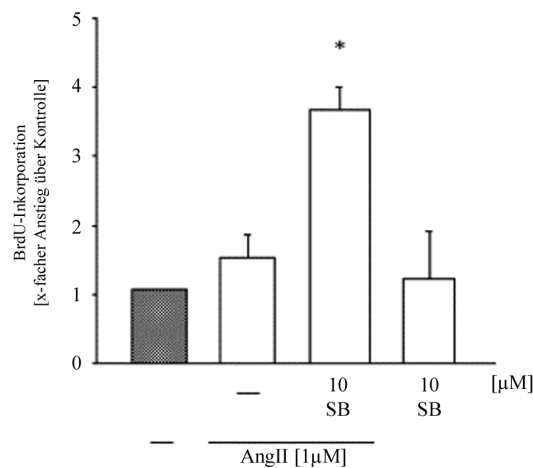


Abbildung 4: Die Angiotensin II-induzierte DNA-Synthese wird durch die p38 Kinase negativ reguliert. Humane koronare VSMC wurden mit Angiotensin II (1µM) ± p38 Kinase Inhibitor SB203580 (SB, 10µM) stimuliert. Nach 24h wurde die DNA-Synthese mittels Inkorporation des Thymidinanalogs BrdU ermittelt. BrdU-positive Zellen wurden in 4-6 Gesichtsfeldern pro Platte gezählt und auf die Gesamtzellanzahl bezogen. Die Daten sind als x-facher Anstieg über unstimulierte Kontrollzellen angegeben. Mittelwerte ± SEM, * P < 0.05 vs. unstimulierte VSMC sind präsentiert.

2.2 Anti-atherosklerotische Effekte von PPARs in vaskulären/ inflammatorischen Zellen

2.2.1 PPAR α -und PPAR γ -Liganden hemmen die monozytäre Migration

Ein zentraler Prozess in der frühen Entstehungsphase des atherosklerotischen Plaques ist die Migration von Monozyten aus dem Blutstrom in den vaskulären subendothelialen Raum. [3] Diese Extravasation wird massgeblich von lokal produzierten Chemokinen stimuliert. Einer der stärksten chemotaktischen Stimuli für Blutmonozyten ist das C-C Chemokine MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), welches von vaskulären Endothelzellen und VSMC produziert wird. So kommt es bei MCP-1 Defizienz zu hoch signifikant weniger atherosklerotischer Plaqueentstehung in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen. [42]

Zur Aufklärung direkter anti-atherosklerotischer Effekte von Aktivatoren der PPAR-Rezeptoren untersuchten wir die Wirkung verschiedener PPAR α - und PPAR γ -Liganden auf die MCP-1-induzierte Migration von THP-1 Monozyten. [21] Zusätzlich untersuchten wir die Bedeutung des heterodimeren PPAR-Partners RXR α mittels Einsatz eines spezifischen RXR α -Liganden. Wie in Abbildung 5A dargestellt kommt es nach Aktivierung von PPAR γ durch die Thiazolidinedione Troglitazon und Rosiglitazon zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der MCP-1-stimulierten Monozytenmigration. Die Vorbehandlung mit den PPAR α -Liganden WY-14643 und ETYA (5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid), sowie mit dem RXR α -Liganden AGN 4204 führte ebenfalls zu einer signifikanten Blockade der MCP-1 induzierten Migration (Abbildung 5B). Die antimigratorische Wirkung der PPAR-Aktivierung stellt eine anti-atherosklerotische Funktion der Rezeptoren dar, welche die frühen Phase der Plaqueentstehung blockiert.

Zusätzlich zum chemotaktischen Signal ist die Degradation der Basallamina und des interstitiellen Stromas eine Voraussetzung für die Extravasation und Emigration von Blutmonozyten. [43] Diese Degradation wird durch sogenannte Matrixmetalloproteinasen (MMPs) vorgenommen, welche zu grossen Anteilen von Monozyten sezerniert werden. MMPs sind eine Familie von Endopeptidasen, die sämtliche Formen extrazellulärer Matrixproteine verdauen können. [44] MMP-9 ist ein Mitglied der MMP-Familie, welches in hohem Masse in atherosklerotischen Läsionen exprimiert wird. [45]

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der anti-migratorischen Wirkungen von PPAR-Liganden aufzuklären untersuchten wir die Expression von MMP-9 im Zellkulturüberstand in der Ab- und Anwesenheit der angegebenen Aktivatoren. Die Aktivierung von PPAR γ durch Troglitazon und Rosiglitazon führte zu einer signifikanten Reduktion von MMP-9, wohingegen die PPAR α -Aktivatoren WY-14643 und ETYA keinen Effekt hatten (Abbildung 6A und 6B). Inkubation mit dem RXR α -Ligand AGN 4204 führte ebenfalls zu einer Reduktion von MMP-9 (Abbildung 6B). Diese Daten weisen daraufhin, dass die antimigratorische Wirkung von PPAR γ und RXR α über die Reduktion des matrixverdauenden Enzyms MMP-9 vermittelt wird, wobei PPAR α -Liganden über andere Mechanismen die monozytäre Migration blockieren.

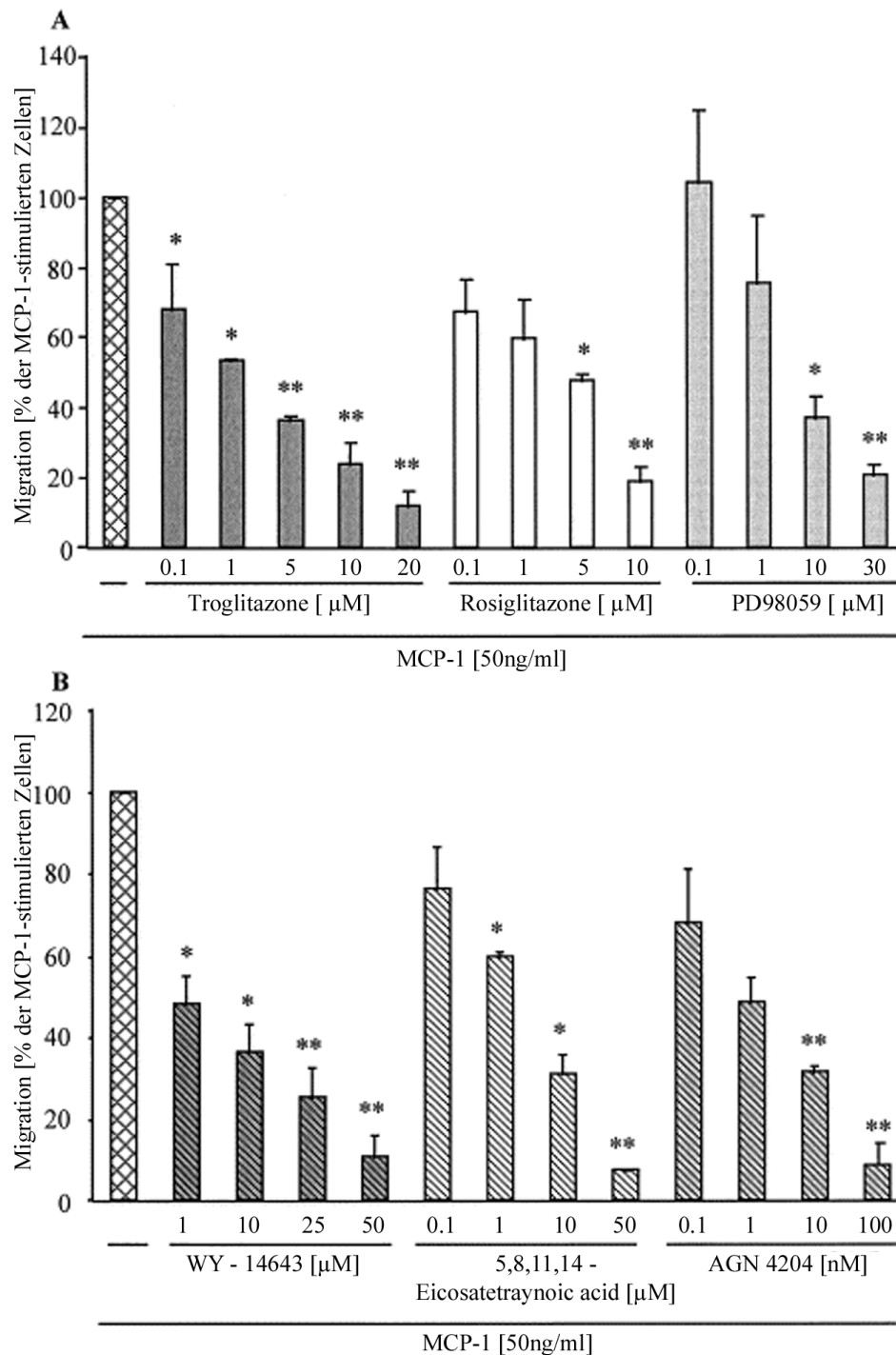


Abbildung 5: PPAR γ , PPAR α und RXR α Liganden inhibieren die MCP-1-induzierte THP-1 Monozytenmigration. THP-1 Monozyten wurden mit den PPAR γ Liganden Troglitazon oder Rosiglitazon, dem MEK-Inhibitor PD98059 (A.), den PPAR α Liganden WY-14643 oder 5,8,11,14-Eicosatetraynoic Acid oder dem RXR α Liganden AGN4204 (B.) 30min behandelt und anschliessend wurde die Migration zu MCP-1 im modifizierten Boydenkammerassay analysiert. Die Migration ist als Prozentangabe der Vehikel (DMSO)-behandelten, MCP-1-stimulierten Zellen angegeben. Die Experimente wurden 3 mal im Duplikat wiederholt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ vs. MCP-1+DMSO präsentiert.

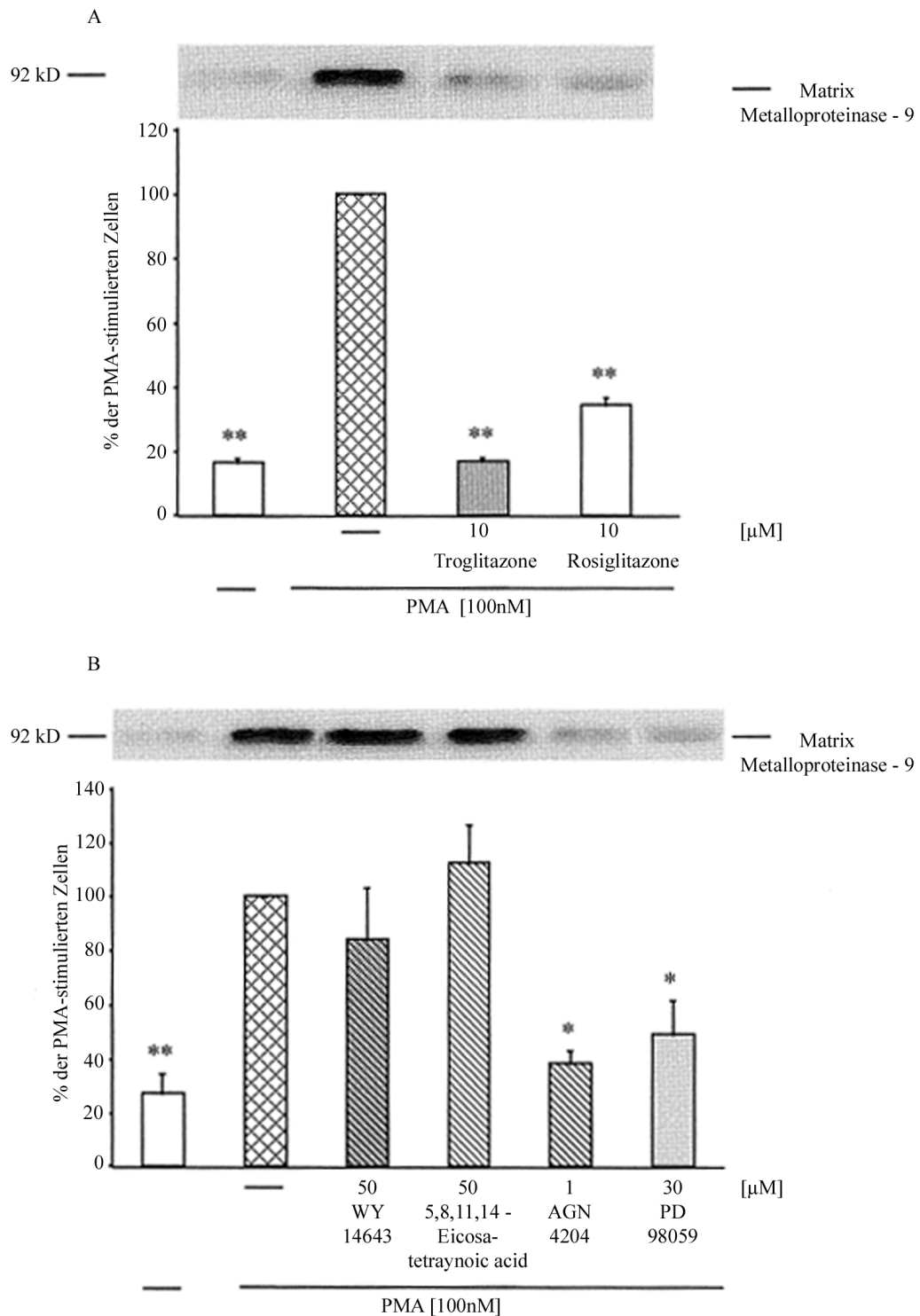


Abbildung 6: PPAR γ und RXR α Liganden inhibieren MMP-9 Expression im Zellkulturüberstand von THP-1 Monozyten. Die Zellen wurden mit den PPAR γ Liganden Troglitazon oder Rosiglitazon (A.), den PPAR α Liganden WY-14643 oder 5,8,11,14-Eicosatetraynoic Acid, dem RXR α Liganden AGN4204 oder dem MEK-Inhibitor PD98059 (B.) vorbehandelt und anschliessend mit PMA inkubiert. Nach 24h wurde der Zellüberstand entnommen und die Expression von MMP-9 mittels Western Immunoblotting ermittelt. Im oberen Anteil der Grafiken sind repräsentative Blots von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Grafik zeigt densitometrische Analysen der MMP-9 Expression, welche in Prozent der PMA/DMSO-stimulierten Zellen angegeben sind. Die densitometrischen Daten sind als Mittelwert \pm SEM, * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ vs. PMA+DMSO präsentiert.

2.2.2 Regulation der PPAR γ -Expression in Monozyten

Die anti-atherosklerotische Wirkung von PPAR γ steht in direkter Abhängigkeit der Expressionslevel des Rezeptors in der Gefässwand bzw. in vaskulären Zellen. Die PPAR γ -Expression wird zu grossen Teilen von lokalen Wachstumsfaktoren reguliert. [46] Zur weiteren Charakterisierung von monozytärem PPAR γ untersuchten wir die Regulation der Expression durch einen Wachstumsfaktor, der stark in atherosklerotischen Läsionen exprimiert wird. THP-1 Monozyten wurden mit TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) stimuliert und die Expression von PPAR γ auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. [47] Die Stimulation mit TGF- β 1 führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA der PPAR γ 1-Isoform, deren Expression bisher in Monozyten beschrieben war (Abbildung 7A und 7B). Interessanterweise kam es gleichzeitig zur Induktion der PPAR γ 2 Isoform, die bisher lediglich im Fettgewebe identifiziert wurde (Abbildung 7A und 7B). [48] Die Stimulation auf mRNA Ebene liess sich auf Proteinebene bestätigen.

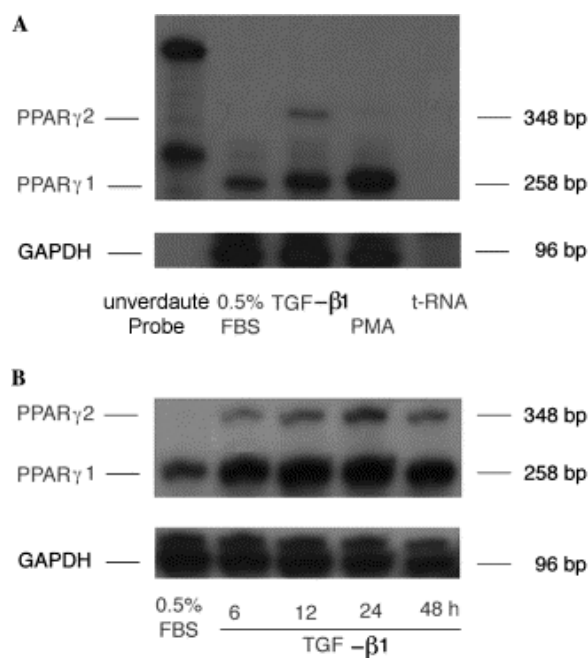


Abbildung 7: TGF- β 1 stimuliert PPAR γ 1 und PPAR γ 2 mRNA Expression. A.) THP-1 Monozyten wurden für 24h mit TGF- β 1 (5ng/ml) oder PMA (100nM) behandelt und anschliessend Gesamt RNA isoliert. Zur Detektion der PPAR γ 1 und γ 2 mRNA Isoformen wurden RNase Protection Assays verwendet. Die linke Spur zeigt zwei Banden der unverdauten PPAR γ Probe. Als Negativkontrolle wurde Hefe t-RNA benutzt. GAPDH wurde verwendet zur Ladungskontrolle. Ein repräsentatives Autoradiogramm von 3 verschiedenen Experimenten ist dargestellt. B.) THP-1 Monozyten wurden mit TGF- β 1 (5ng/ml) behandelt und Gesamt RNA wurde nach den angegebenen Zeitintervallen isoliert. RNase Protection Assays wurden durchgeführt (siehe A.). Ein repräsentatives Autoradiogramm von 3 verschiedenen Experimenten ist dargestellt.

Zur weiteren Charakterisierung transkriptioneller Mechanismen der prominenten PPAR γ 2 Stimulation, führten wir in THP-1 Monozyten transiente Transfektionsexperimente durch, in denen die Promotoraktivität des PPAR γ 2 Promotors mit Hilfe eines Reportergenkonstruktes ermittelt wurde. Übereinstimmend mit einer Stimulation auf Transkriptionsebene kam es nach TGF- β 1 Behandlung zu einem 3.4-fachen Anstieg der PPAR γ 2 Promotoraktivität (Abbildung 8). Die Mutation von zwei Bindungsstellen für C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) Transkriptionsfaktoren reduzierte die TGF- β 1 vermittelte Stimulation des PPAR γ 2 Promotors um 65% (Abbildung 8). Somit scheint die Bindung von C/EBP Proteinen eine wichtige Bedeutung für die Regulation von monozytärem PPAR γ 2 durch TGF- β 1 zu haben.

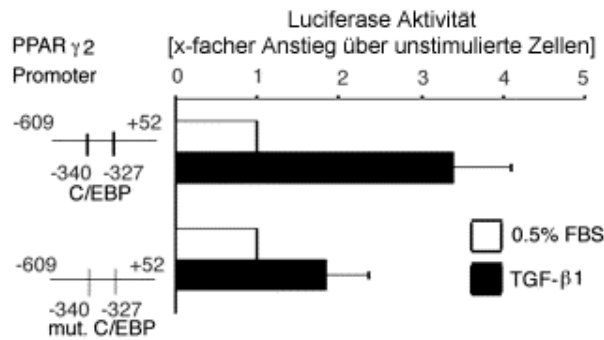


Abbildung 8: TGF-β1 induziert PPARγ2 Transkription. THP-1 Monozyten wurden mit den angegebenen Wildtyp- und mutierten PPARγ2 Promotor Luciferase Konstrukten transfiziert und anschliessend mit TGF-β1 (5ng/ml) stimuliert. Nach 24h wurde die Luciferaseaktivität bestimmt und zur Aktivität einer kotransfizierten Renilla Luciferase normalisiert. Die Resultate sind als x-facher Anstieg über unbehandelte THP-1 Monozyten angegeben. Die Experimente wurden 3 mal wiederholt und die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

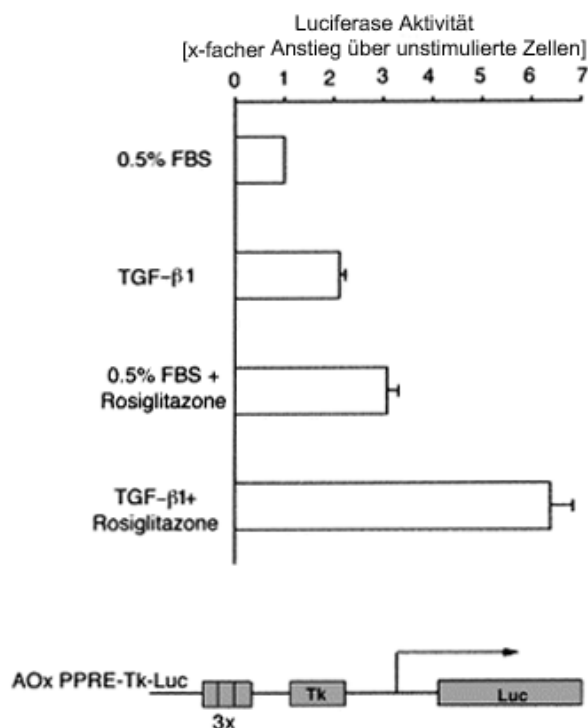


Abbildung 9: TGF-β1 stimuliert die transkriptionelle Aktivität von PPARγ. THP-1 Monozyten wurden mit dem angegebenen Luciferase Reporterkonstrukt transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit TGF-β1 (5ng/ml) ± Rosiglitazon (10μM) behandelt. Nach 24h wurde die Luciferaseaktivität bestimmt und zur Aktivität einer kotransfizierten Renilla Luciferase normalisiert. Die Resultate sind als x-facher Anstieg über unbehandelte THP-1 Monozyten angegeben. Die Experimente wurden 3 mal wiederholt und die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Abschliessend untersuchten wir, ob die Stimulation der PPARγ Expression durch TGF-β1 auch in einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von PPARγ resultierte. Hierzu wurden transiente Transfektionsexperimente mit einem 3 Acyl-CoA oxidase PPRE-Tk-Luciferase Reporter Vektor durchgeführt. Im Einklang mit den Expressionsdaten kam es unter TGF-β1 Stimulation zu einem 2.1-fachen Anstieg der basalen PPRE-Aktivität und zu einem 6.4-fachen Anstieg in der Anwesenheit des PPARγ-Liganden Rosiglitazon (Abbildung 9).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie zeigen, dass PPARγ Expression und Funktion massgeblich durch Wachstumsfaktoren reguliert wird, welche in atherosklerotischen Läsionen exprimiert sind. Diese Regulation spielen eine wichtige Rolle in der Modulation anti-atherosklerotischer Effekte von PPARγ in der Gefässwand.

Zusätzlich identifizierten wir die PPAR γ 2 Isoform in monzytären Zellen. Die Aufklärung der Funktion dieser Isoform ausserhalb von Fettgewebe Bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

2.2.3 PPAR γ -Liganden hemmen die Zellzyklusprogression in VSMC

Wie bereits oben beschrieben spielt die Proliferation von VSMC in den späten Phasen der atherosklerotischen Plaqueentstehung eine zentrale pathogenetische Rolle. [5] Pro-atherosklerotische Faktoren in der Gefässwand, wie z.B. Angiotensin II, stimulieren die Proliferation dieser Zellen und unterstützen damit die Progression der Plaqueentstehung. [35] Neben anti-atherosklerotischen Effekten auf inflammatorische Gefässwandzellen, konnte in Voruntersuchungen gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR γ durch Glitazone die Proliferation von VSMC in-vitro und in-vivo hemmt. [49]

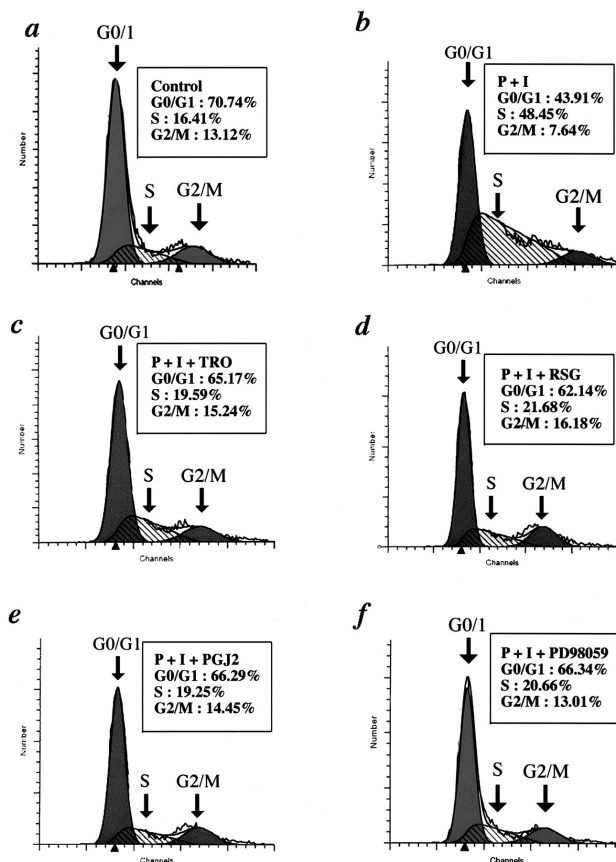


Abbildung 10: PPAR γ Liganden blockieren die mitogen-induzierte G0/G1-S-Phase Progression. VSMC der Rattenaorta wurden nach Vorbehandlung mit Troglitazon (c.TRO, 10 μ M), Rosiglitazon (d.RSG, 10 μ M), PGJ2 (e.5 μ M) oder dem MEK-Inhibitor PD98059 (f.30 μ M) für 24h mit PDGF (20ng/ml) und Insulin (1 μ M) inkubiert. Anschliessend erfolgte eine DNA-Färbung mit Propidiumjodid und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative DNA-Histogramme von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieser anti-proliferativen PPAR γ Funktion aufzuklären, untersuchten wir die Effekte von verschiedenen PPAR γ Aktivatoren auf die Zellzyklusprogression von VSMC und auf die Expression und Aktivität der beteiligten Zellzyklusmoleküle. [22] Zur Analyse der mitogen-aktivierten Zellzyklusprogression von der G0/G1-Phase in die S-Phase verwendeten wir eine flusszytometrische Methode mit der man mittels Propidiumjodid-DNA-Färbung die Menge der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen quantifizieren kann. Man sieht in Abbildung 10, dass es nach mitogener Stimulation zu einem deutlichen Anstieg der Zellenanzahl in der S-Phase kommt.

Behandelt man diese Zellen mit den PPAR γ Liganden Troglitazon, Rosiglitazon oder dem endogenen Aktivator 15-deoxy-^{12,14} Δ prostaglandin J₂ (PGJ₂), so kommt es zu einer signifikanten Blockade des G0/G1-S-Phase Übertritts.

Die Phosphorylierung des Rb-Proteins ist eine Voraussetzung für die Progression von Zellen von der G0/G1-Phase in die S-Phase. [38] Um die zugrundeliegenden Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von PPAR γ Liganden auf die Zellzyklusprogression aufzuklären, untersuchten wir die mitogen-induzierte Rb-Phosphorylierung in VSMC in Ab- und Anwesenheit von PPAR γ -Liganden. Alle untersuchten PPAR γ Liganden führten zu einer prominenten Blockade der mitogen-aktivierten Rb-Phosphorylierung in VSMC der Rattenaorta und aus humanen Koronararterien (Abbildung 11A und 11B).

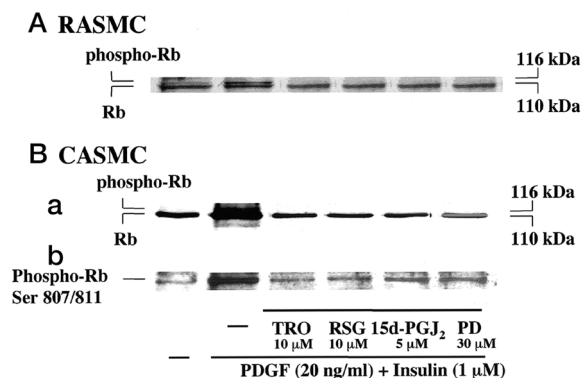


Abbildung 11: PPAR γ Liganden hemmen die Phosphorylierung von Rb. VSMC der Rattenaorta (A.) RASMC) und aus humanen Koronararterien (B.) CASMC) wurden mit PDGF (20ng/ml) und Insulin (1 μ M) stimuliert und mit Troglitazon (TRO), Rosiglitazon (RSG), 15d-PGJ₂ oder dem MEK-Inhibitor PD98059 vorbehandelt. Nach 24h wurden Gesamt-Zellproteine mittels Immuno-Western Blotting Experimenten analysiert. Repräsentative Immunoblots von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

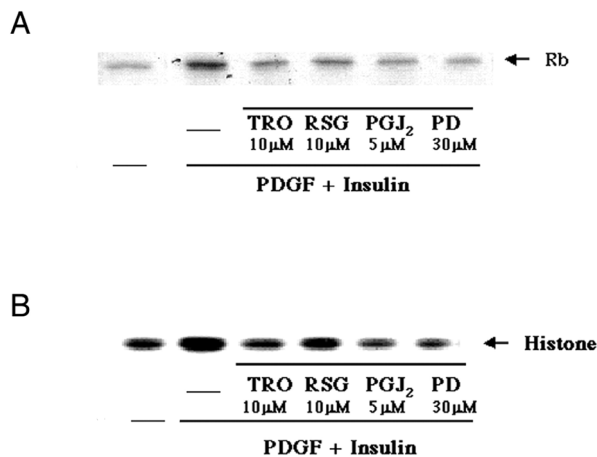


Abbildung 12: PPAR γ Liganden inhibieren cyclin D1- und cyclin E-abhängige Kinaseaktivität. VSMC der Rattenaorta wurden nach Vorbehandlung mit Troglitazon (TRO), Rosiglitazon (RSG), PGJ₂ oder dem MEK-Inhibitor PD98059 (30 μ M) für 24h mit PDGF (20ng/ml) und Insulin (1 μ M) inkubiert. Im Anschluss wurde mit Anti-Cyclin D1 (A.) oder Anti-Cyclin E (B.) Antikörpern die korrespondierenden Kinasen immunopräzipitiert. Die Kinaseaktivität in den Präzipitaten wurde dann mittels Phosphorylierung zugehöriger Substrate (Cyclin D1: lösliches Rb; Cyclin E: Histone) gemessen. Repräsentative Blots von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Die Rb-Phosphorylierung wird durch Holoenzyme aus einer Cycleineinheit und einer katalytischen cyclinabhängigen Kinase induziert, wobei die Cycline D1 und E eine zentrale Funktion haben. Wir untersuchten die Effekte der PPAR γ Liganden auf die cyclin D1- und cyclin E-abhängige Kinase Aktivität mit Hilfe von Immunokomplex-Kinaseassays. Alle PPAR γ Liganden führten zu einer markanten Reduktion der mitogen-induzierten Kinaseaktivitäten (Abbildung 12 A und 12B).

Zusammenfassend liegt den antiproliferativen Effekten von PPAR γ -Liganden eine Inhibierung der Zellzyklusprogression zugrunde. Diese wird hervorgerufen durch die Blockade mitogen-aktivierter zyklinabhängiger Kinaseaktivität, resultierend in einer Reduktion der Rb-Phosphorylierung und der darausfolgenden verminderten Verfügbarkeit von E2F. Diese Studie demonstriert einen zentralen anti-atherosklerotischen Mechanismus von ligand-aktiviertem PPAR γ .

2.2.4 PPAR γ Liganden hemmen die proliferationsfördernde Induktion von p21^{Cip1} in VSMC

Die Blockade der Zellzyklusprogression in VSMC durch PPAR γ Liganden wird durch Inhibierung der cyclin D1- und cyclin E-abhängigen Kinaseaktivitäten hervorgerufen. Diese Kinaseaktivitäten werden massgeblich durch sogenannte cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren reguliert. [50] In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die mitogene Induktion des cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{Cip1} für die Zellzyklusprogression und folgende Proliferation erforderlich ist. [51] In unseren Vorarbeiten führte die Vorbehandlung mit PPAR γ Liganden zur Blockade der mitogenen Stimulation von p21^{Cip1}, was einen potentiellen Mechanismus für die Effekte dieser Substanzen auf den VSMC Zellzyklus darstellen könnte. [22]

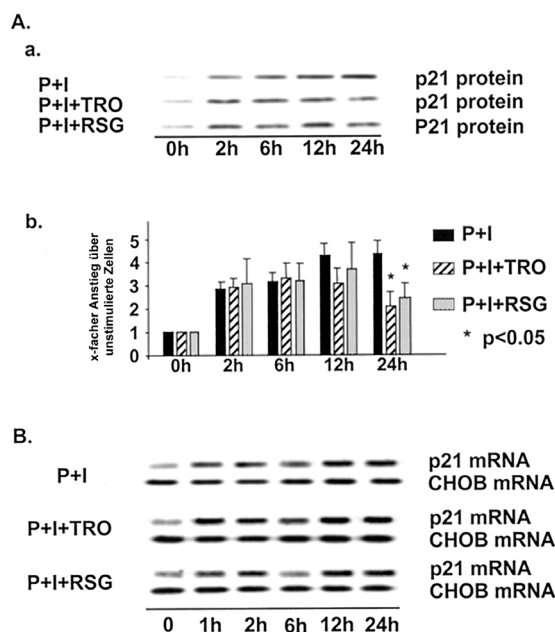


Abbildung 13: PPAR γ Liganden blockieren die mitogen-vermittelte p21^{Cip1} Proteinexpression. A.) a.) VSMC der Rattenaorta wurden mit PDGF (0.67 nM) und Insulin (1 μ M) stimuliert und mit Troglitazon (TRO, 10 μ M) und Rosiglitazon (RSG, 10 μ M) vorbehandelt. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurde Gesamt-Zellprotein isoliert und mittels Western Immunoblotting analysiert. Repräsentative Immunoblots von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. b.) Densitometrische Analyse der Western Immunoblotting Experimente aus A.). Die Resultate sind als x-facher Anstieg über die Expression in unstimulierten Zellen angegeben und die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM präsentiert. B.) Nach Stimulation (siehe A.) wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und mittels Northern Blotting analysiert. Expression des Chinese Hamster Ovary B (CHO B) Gens wurde als Ladungskontrolle verwendet. Repräsentative Northernblots von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Zur weiteren Aufklärung dieser PPAR γ Effekte analysierten wir die p21^{Cip1} Regulation durch PPAR γ Liganden im Zeitverlauf auf Protein- und m-RNA Ebene. [52] Die PPAR γ Liganden Troglitazon und Rosiglitazon inhibierten die mitogen-induzierte Stimulation von p21^{Cip1} Proteinexpression nach 24h (Abbildung 13A). Im Gegensatz zur Proteinregulation hatten die Behandlung mit PPAR γ Liganden keine Auswirkungen auf die mitogen-stimulierte mRNA Expression, was auf eine post-transkriptionelle Regulation hinweist (Abbildung 13B).

Es ist anzunehmen das PPAR γ Liganden auf post-transkriptioneller Ebene die Akkumulation von p21^{Cip1} Protein reduzieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass spezifische Isoformen der Proteinkinase C (PKC) wesentlich an der Regulation von p21^{Cip1} beteiligt sind. [53] Um den Einfluss von PKC auf die PPAR γ -vermittelte Inhibierung von p21^{Cip1} zu untersuchen, behandelten wir VSMC mit verschiedenen pharmakologischen PKC Inhibitoren und analysierten die p21^{Cip1} Expression. Die Vorbehandlung mit dem spezifischen PKC δ Inhibitor Rottlerin führte zu einer konzentrationsabhängigen Blockade vergleichbar den Effekten von PPAR γ Liganden (Abbildung 14).

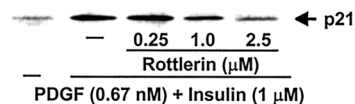


Abbildung 14: Der PKC δ -Inhibitor Rottlerin inhibiert die mitogen-induzierte p21 Proteinexpression. VSMC der Rattenaorta wurden mit PDGF (0.67 nM) und Insulin (1 μ M) stimuliert und mit den angegebenen Konzentrationen Rottlerin vorbehandelt. Nach 24h wurde Gesamt-Zellprotein isoliert und mittels Western Immunoblotting analysiert. Ein repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Zur Untersuchung der Proteinestabilität von p21^{Cip1} wurden VSMC mit Cycloheximid vorbehandelt, um eine de-novo Proteinsynthese zu blockieren. Anschliessend wurde die Protein-Halbwertszeit im Western Immunoblot ermittelt. Die Grafik in Abbildung 15 demonstriert, dass sowohl die PPAR γ Liganden, als auch der PKC δ Inhibitor die Halbwertszeit von p21^{Cip1} verkürzen und die Degradation des Proteins verstärken (Abbildung 15).

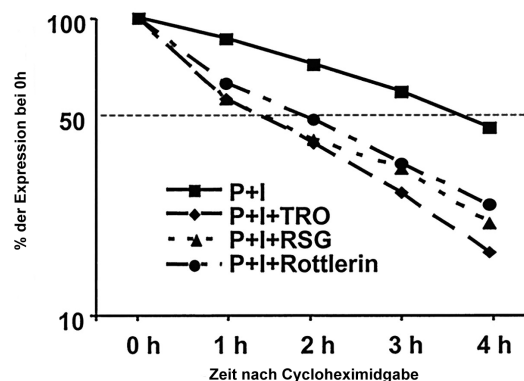


Abbildung 15: PPAR γ Liganden und Rottlerin verstärken die Proteindegradation von p21^{Cip1}. VSMC der Rattenaorta wurden nach 30-minütiger Vorbehandlung mit Troglitazon (TRO, 10 μ M), Rosiglitazon (RSG, 10 μ M) oder Rottlerin (2.5 μ M) mit PDGF (0.67 nM) und Insulin (1 μ M) inkubiert. Vorher waren die Zellen 12h mit Cycloheximid (10 μ g/ml) behandelt worden. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurde Gesamt-Zellprotein isoliert und p21^{Cip1} Protein mittels Western Immunoblotting quantifiziert. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch analysiert und als log% der Expression bei 0h aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Um abschliessend die Bedeutung von PKC δ für den inhibitorischen Effekt von PPAR γ aufzuklären, wurde PKC δ mittels adenoviraler Infektion in VSMC überexprimiert und die Expression von p21^{Cip1} nach PPAR γ Aktivierung wurde untersucht. Die Überexpression von PKC δ verhinderte die Blockade der p21^{Cip1} Reduktion durch PPAR γ Liganden (Abbildung 16). Diese Daten demonstrieren eindeutig, das PPAR γ Liganden die Stabilität von p21^{Cip1} über die Inhibierung von PKC δ regulieren. Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie nachweisen, dass die antiproliferative Wirkung von PPAR γ Liganden, zumindest teilweise, über die Blockade der mitogenen p21^{Cip1} Induktion vermittelt wird. Diese Regulation scheint durch die Blockade von PKC δ Signaling via Phosphataseaktivierung erreicht zu werden. Die Regulation von zytoplasmatischen Signaltransduktionswegen durch den ligand-aktivierten, nukleären Hormonrezeptor

PPAR γ könnte eine Grundlage für zukünftige pleiotrope, anti-atherosklerotische PPAR γ Effekte darstellen.

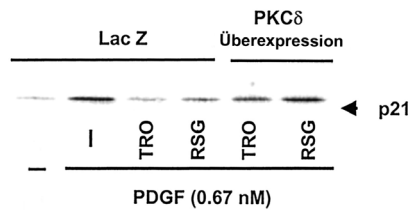


Abbildung 16: Die Überexpression von PKC δ verhindert den inhibitorischen Effekt von PPAR γ Liganden auf die mitogene Induktion von p21^{Cip1}. VSMC der Rattenaorta wurde mit einem Adenovirus infiziert, der das PKC δ Gen enthält (20pfu/Zelle). Ein LacZ Gen-enthaltender Adenovirus diente als Infektionskontrolle, 48h nach Infektion wurden die Zellen mit PDGF \pm Troglitazon (TRO, 10 μ M) oder Rosiglitazon (RSG, 10 μ M) für 24h inkubiert und p21^{Cip1} Proteinexpression wurde mittels Western Immunoblotting analysiert. Ein repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

2.2.5 PPAR α -Liganden hemmen die Migration von VSMC

Neben PPAR γ ist eine weitere PPAR Isoform, PPAR α , in vaskulären Zellen exprimiert.[16] In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass PPAR α ebenfalls anti-atherosklerotische Wirkungen in vaskulären Zellen und in-vivo hat. [16] In der späten Phase der Plaqueentstehung kommt es parallel zur Proliferation von neointimalen VSMC, zur Migration von VSMC aus der vaskulären Media in die neugeformte Neointima. Unterbindet man die Einwanderung dieser Zellen in neo-/ subintimale Gefäßschichten so lässt sich die Entstehung atherosklerotischer Läsionen signifikant reduzieren.

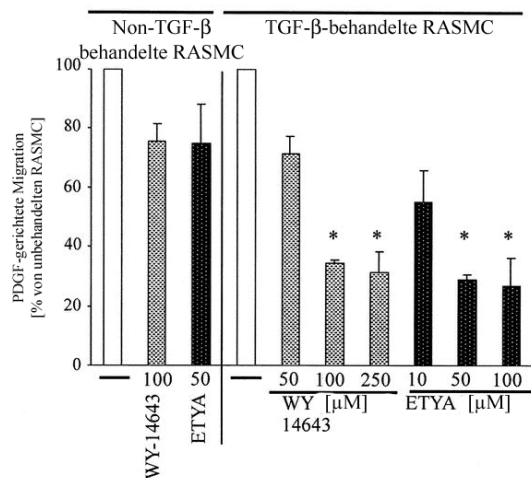


Abbildung 17: PPAR α Liganden inhibieren die PDGF-gerichtete Migration von TGF- β -vorbehandelten VSMC. Die Migration von VSMC der Rattenaorta wurde durch die Zugabe von PDGF (20ng/ml) in das untere Kompartiment einer modifizierten Boydenkammer induziert. Die Migrationsfilter wurden mit Vitronectin (10 μ g/ml) beschichtet. Die Zellen wurden für 12h mit TGF- β (5ng/ml) \pm WY-14643 (50-250 μ M) oder 5,8,11,14-Eicosatetranoic Acid (ETYA, 10-100 μ M) vorbehandelt. Die Migration ist in % der unbehandelten Zellen angegeben. Die Experimente wurden 3 mal im Duplikat wiederholt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, * P < 0.05 vs. unbehandelte VSMC präsentiert.

In Vorarbeiten konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Law bereits die anti-migratorische Wirkung von PPAR γ Liganden in VSMC nachweisen. [54] Wir untersuchten die Wirkung verschiedener PPAR α Liganden auf die PDGF-stimulierte Migration von VSMC der Rattenaorta. [20] Die Vorbehandlung von VSMC mit PPAR α Liganden führte nach Aktivierung der Zellen durch TGF- β zu einer signifikanten Reduktion der PDGF-induzierten Migration (Abbildung 17).

Die VSMC Migration erfordert die Interaktion der Zellen mit der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM). Diese Interaktion wird durch VSMC Oberflächenrezeptoren aus der Gruppe der Integrine reguliert. $\beta 5$ -Integrine sind zentrale VSMC-Rezeptoren, die in atherosklerotischen Läsionen heraufreguliert werden und die Interaktion der Zelle mit den EZM Molekülen Vitronektin und Osteopontin vermitteln. [55, 56] $\text{PPAR}\alpha$ Liganden hemmen die Protein- und mRNA Expression des $\beta 5$ -Integrins. Diese Inhibierung könnte einen Mechanismus für die anti-migratorischen Wirkungen dieser Substanzen darstellen. In weiterführenden Untersuchungen demonstrierten wir in transienten Transfektionsexperimenten, dass die $\text{PPAR}\alpha$ -vermittelte Inhibierung der TGF- β -stimulierten $\beta 5$ -Integrinexpression auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Abbildung 18).

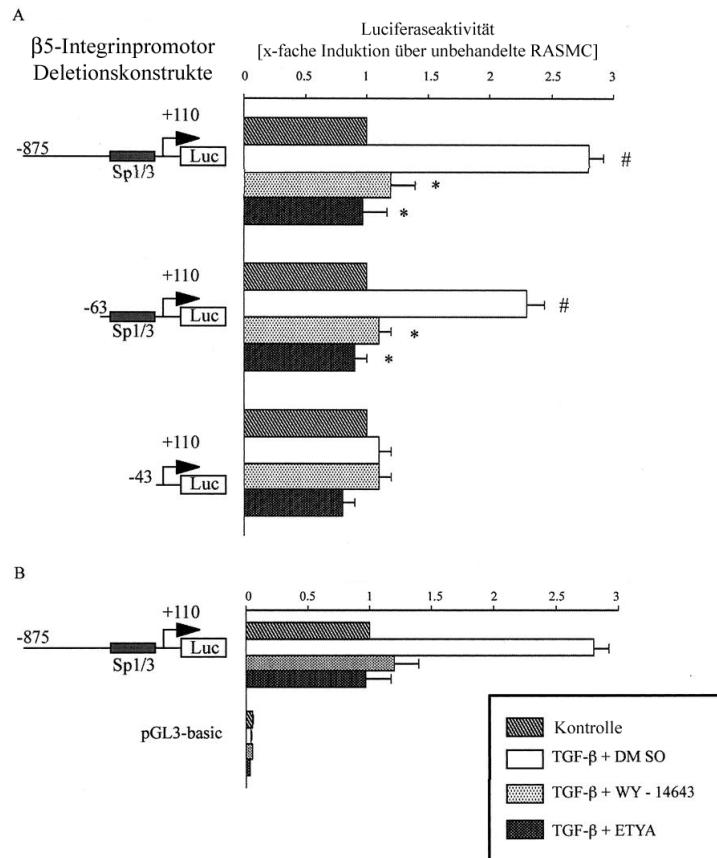


Abbildung 18: $\text{PPAR}\alpha$ Liganden hemmen die TGF- β -induzierte $\beta 5$ -Integrintranskription. VSMC der Rattenaorta wurden mit den angegebenen $\beta 5$ -Integrinpromotorkonstrukten transfiziert. Anschliessend wurden die Zellen mit TGF- β (5ng/ml) \pm WY-14643 (100 μ M) oder 5,8,11,14-Eicosatetranoic Acid (ETYA, 50 μ M) behandelt. Nach 24h wurde die Luciferaseaktivität gemessen und zur Aktivität eines kotransfizierten Renilla Luciferasekonstruktes normalisiert. Die Ergebnisse sind als x-facher Anstieg über die Aktivität in unbehandelten Zellen angegeben. A.) $\beta 5$ -Integrinpromotor Deletionskonstrukte B.) Negativkontrolle mittels Transfektion des pGL3-Basisvektors. Die Experimente wurden 3 mal wiederholt und die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, # $P < 0.05$ vs. unbehandelte VSMC, * $P < 0.05$ vs. TGF- β / Vehikel.

Durch die Interaktion von $\text{PPAR}\alpha$ mit dem TGF- β -regulierten Transkriptionsfaktor Smad4 wird die Transkription des $\beta 5$ -Integrins an einem TGF- β -response Element im $\beta 5$ -Integrinpromotor verhindert (Abbildung 19). Interaktionen zwischen ligandaktivierten PPARs und Smad-Transkriptionsfaktoren konnten parallel von einer anderen Arbeitsgruppe für ligand-aktiviertes $\text{PPAR}\gamma$ nachgewiesen werden. Die PPAR-Smad Interaktion stellt einen grundlegenden molekularen, anti-atherosklerotischen Mechanismus der PPARs dar, welcher in Zukunft zur Entwicklung spezifischer Therapien beitragen könnte.

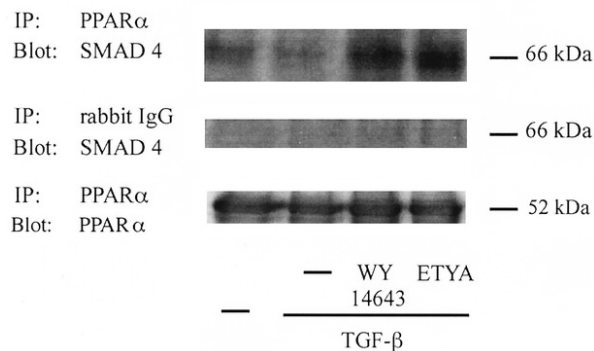


Abbildung 19: Ligand-aktiviertes PPAR α bindet an SMAD 4 Transkriptionsfaktoren. VSMC der Rattenaorta wurden mit TGF- β (5ng/ml) \pm WY-14643 (100 μ M) oder 5,8,11,14-Eicosatetranoic Acid (ETYA, 50 μ M) behandelt. Nach 4h wurde nukleäre Proteinextrakte isoliert und mit anti-PPAR α oder unspezifischem IgG immunopräzipitiert. Repräsentative Immunoblots von 3 unabhängigen Experimenten mit Antikörpern gegen SMAD 4 oder PPAR α sind dargestellt.

2.3 Hemmung der in-vivo Atherogenese durch PPAR-Aktivierung

2.3.1 Anti-atherosklerotische Effekte von PPAR γ in LDL-R-defizienten Mäusen

In den dargestellten Arbeiten konnten wir in in-vitro Experimenten multiple anti-atherosklerotische Wirkungen von ligandaktiviertem PPAR γ und PPAR α nachweisen. Diese inhibitorischen Effekte betreffen sowohl die früheren Phasen der Atherogenese, wie die Monozytenmigration, als auch spätere Phasen der VSMC-Proliferation und -Migration. Zusätzlich unterliegt die Expression des PPAR γ Transkriptionsfaktor im Monozyten der Regulation durch andere wichtige Wachstumsfaktoren. Diese Regulation beeinflusst verständlicherweise die Funktion des nukleären Rezeptors. Zur Klärung der in-vivo Wirkungen von ligand-aktiviertem PPARs auf den Atherogeneseprozess behandelten wir zwei verschiedene atherosklerotische Tiermodelle mit dem PPAR γ Liganden Troglitazon und analysierten die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.

Thiazolidindeone verbessern als sogenannte Insulinsensitizer die Wirkung von Insulin am metabolischen Endorgan und führen zur Senkung des Plasmainsulins. [16] Eine verbesserte Insulinwirkung könnte über die Normalisierung anderer metabolischer Parameter zur Reduktion atherosklerotischer Plaqueentstehung beitragen. Zur Beurteilung direkter vaskulärer Effekte von PPAR γ Liganden wurden zwei verschiedene Tiermodelle der Atherosklerose verwendet. [57] LDL-R (low density lipoprotein receptor)-defiziente Mäuse erhielten eine hohe Fettdiät oder eine hohe Fruktosediät. Beide Gruppen entwickeln atherosklerotische Gefässläsionen, wobei die hohe Fettdiätgruppe zusätzlich hyperglykämisch und hyperinsulinämisch wird und somit einen Typ 2 Diabetes mellitus entwickelt. Diese Veränderungen bleiben bei der hohen Fruktosediät aus, so dass man in diesem Modell insulin-unabhängige Effekte besser beurteilen kann. Für 3 Monate wurde den Tieren 400mg/ kg KG Troglitazon peroral mit dem Futter verabreicht. Anschliessend wurde die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen im Verlauf der Aorta mit Hilfe einer Sudan IV-Färbung und computergestützter Bildanalyse vorgenommen. Die Behandlung mit dem PPAR γ Liganden Troglitazon führte in beiden Tiermodellen zu einer signifikanten Reduktion der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta (Abbildung 20 und 21).

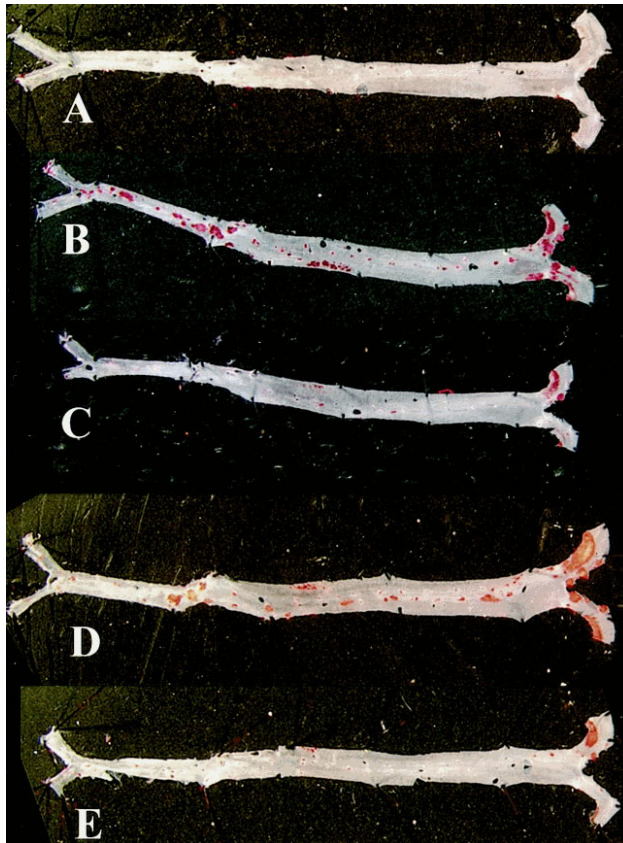


Abbildung 20: Der PPAR γ Ligand Troglitazon inhibiert die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in LDL-R-defizienten Mäusen. Zur Analyse der fettreichen atherosklerotischen Plaques wurde die Aorta mit Sudan IV gefärbt. A.) Normaldiät B.) Hohe Fettdiät C.) Hohe Fettdiät + Troglitazon D.) Hohe Fruktosediät E.) Hohe Fruktosediät + Troglitazon.

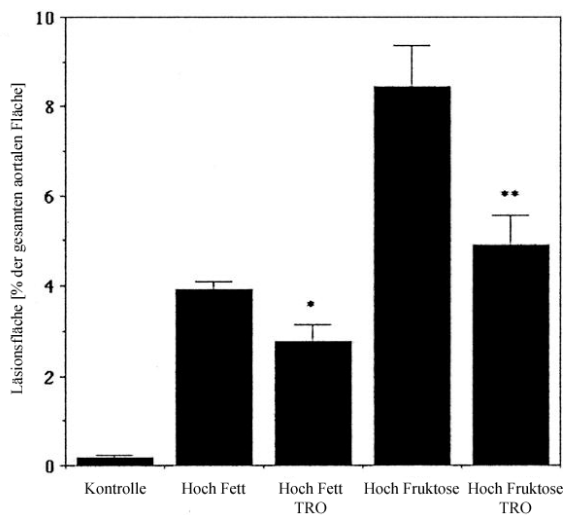


Abbildung 21: Quantifizierung der anti-atherogenen Aktivität von Troglitazon in LDL-R-defizienten Mäusen. Der Mittelwert der aortalen atherosklerotischen Läsionsfläche (Sudan IV-Färbung) wurde in den in Abb. 20 beschriebenen Gruppen mittels computer-gestützter Bildanalyse quantifiziert. Troglitazon führte zur signifikanten Reduktion der mittleren Läsionsfläche: Hoch Fett 30% Reduktion (* $P < 0.05$ vs. Hoch Fett alleine); Hoch Fruktose 42% Reduktion (** $P < 0.05$ vs. Hoch Fruktose alleine).

In den LDL-R-defizienten Mäusen mit hoher Fettdiät normalisierte Troglitazon die Insulinplasmaspiegel, hatte aber keine Wirkung auf die Plasmaglukoselevel. In der Gruppe mit hoher Fruktosediät beeinflusste Troglitazon weder Plasmainsulin noch Plasmaglukose. Im Gegensatz dazu senkte Troglitazon die Gesamtcholesterin-Plasmaspiegel in der hohen Fruktosediätgruppe, hatte aber keinen Effekt auf das

Gesamtcholesterin in den Tieren, die eine hohe Fettdiät erhielten. Zusammenfassend kommt es unter Troglitazon Behandlung in den beiden Tiermodellen nicht zu einer konsistenten Verbesserung metabolischer Parameter. Da Troglitazon in beiden Tiermodellen zu einer markanten Reduktion der atherosklerotischen Läsionsbildung führt, sind daher direkte vaskuläre Effekte des PPAR γ Liganden anzunehmen. Ein direkter vaskulärer Mechanismus der anti-atherosklerotischen PPAR γ Wirkung wird zusätzlich durch eine signifikante Blockade der vaskulären Makrophagenakkumulation durch Troglitazon unterstützt (Abbildung 22).

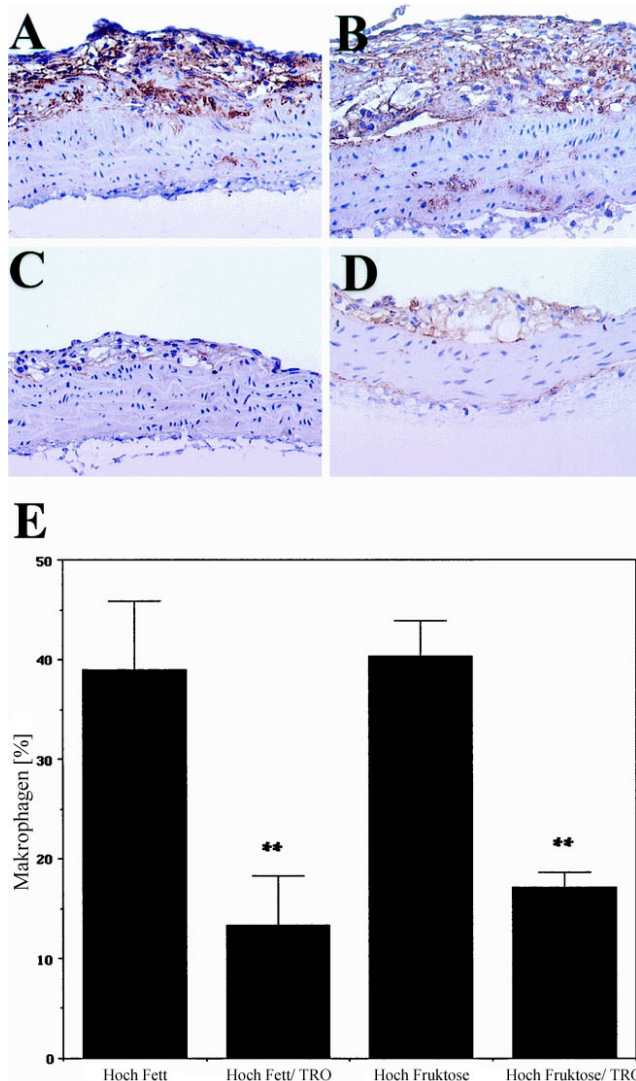


Abbildung 22: Troglitazon inhibiert die Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen. Paraffinschnitte aus dem Aortenbogen wurde immunhistochemisch mit dem Makrophagen erkennenden Antikörpern anti-CD68 gefärbt. A.) Hohe Fettdiät B.) Hohe Fettdiät + Troglitazon C.) Hohe Fruktosediät D.) Hohe Fruktosediät + Troglitazon E.) Quantifizierung des Makrophagengehaltes mittels computergestützter Bildanalyse Reduktion (** P < 0.05 vs. Hoch Fett/ Fruktose alleine).

Zusammenfassend konnten wir in den vorgestellten Studien zeigen, dass ligand-aktivierte PPARs multiple anti-atherosklerotische Effekte in-vitro vermitteln, welche in einer anti-atherosklerotischen Wirkung im lebenden Organismus resultieren.

2.3.2 Hemmung der Angiotensin II-vermittelten Atherogenese durch PPAR γ

In in-vitro Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass PPAR α - und PPAR γ -Aktivatoren multiple pro-atherosklerotische Angiotensin II Effekte inhibieren. PPAR γ

Liganden blockieren die Angiotensin II-vermittelte Aktivierung des mitogenen Signaltransduktionsweges MAPK ERK1/2 und inhibieren die Angiotensin II-stimulierte DNA Synthese und Migration in VSMC. [24] In in-vivo Experimenten blockierten PPAR α Liganden oxidative und pro-inflammatorische Effekte von Angiotensin II. [58] Im Einklang damit, inhibierten PPAR γ Liganden zahlreiche pro-atherosklerotische Effekte, wie die vaskuläre DNA-Synthese und VCAM-1 Expression in Angiotensin II-infundierten, hypertensiven Ratten. [59] Zur Klärung ob PPAR γ Aktivierung auch die Angiotensin II-vermittelte Atherogenese inhibiert, analysierten wird die atherosklerotische Plaqueentstehung unter Glitazonbehandlung in LDL-R-defizienten Mäusen, die für 2 Monate mit Angiotensin II infundiert wurden. [25] Rosiglitazon reduzierte die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta um 61%, wobei signifikante Änderungen von metabolischen Parametern, wie Cholesterin, Triglyzeride, Insulin und Glukose nicht beobachtet wurden. Die Reduktion atherosklerotischer Plaqueentstehung war assoziiert mit der Suppression des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor Egr-1 in der Aorta. Zusätzlich waren zahlreiche Egr-1 Zielgene (TNF α , ICAM-1, MCP-1) durch PPAR γ Aktivierung supprimiert. Die Inhibierung der Egr-1 Expression scheint, zumindest teilweise, die anti-atherosklerotische Wirkung der PPAR γ Aktivierung bei der Angiotensin II-abhängigen Atherogenese zu erklären.

Die beschriebenen pro-atherosklerotischen Wirkungen von Angiotensin II und anti-atherosklerotischen Effekte ligand-aktivierter PPARs scheinen in der Vaskulatur auf verschiedenen Ebenen zu interagieren. Der Nachweis das PPAR Aktivatoren pro-atherogene Angiotensin II Effekte blockieren können, unterstreicht die pathophysiologische Verbindung dieser beiden System.

3. Zusammenfassung

Die Entstehung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen ist ein chronischer Prozess, welcher durch vaskuläre pro-atherosklerotische Wachstumsfaktoren und anti-atherosklerotisch wirkende Modulatoren in der Gefäßwand reguliert wird. Die initialen Schritte der Atherogenese entsprechen einer vaskulären Inflammation, welche im Verlauf eine Reihe von funktionellen Veränderungen (Migration, Proliferation) lokaler VSMC induziert. [1, 5] Angiotensin II ist sowohl in in-vitro als auch in in-vivo Studien als ein zentraler pro-atherosklerotischer Wachstumsfaktor identifiziert worden. Im Rahmen dieser Studien konnten wir zeigen, dass Angiotensin II als pro-inflammatorischer Faktor einen initialen Schritt in der Atherogenese, die Migration von Blutmonozyten, direkt induziert. [14] Diese Daten sind im Einklang mit einer Reihe von inflammationsfördernden Effekten von Angiotensin II in vaskulären/ inflammatorischen Zellen. [60] Zusätzlich stimuliert Angiotensin II in der Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren die Proliferation von VSMC über die Aktivierung verschiedener Zellzyklusmoleküle. [15] Die Proliferation von VSMC verstärkt das Plaquewachstum in den späten Phasen der Atherosklerose. Pro-atherosklerotische in-vitro Effekte von Angiotensin II resultieren in einer massiven Zunahme atherosklerotischer Läsionen durch Angiotensin II im Tiermodell. [13, 25] Die pro-atherosklerotische Funktion von Angiotensin II wird parallel durch klinische Daten unterstützt, in denen gezeigt wird, dass die Angiotensin II Blockade durch ACE-Inhibitoren oder AT1-R Antagonisten zu einer Reduktion atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen führt, was letztendlich in einer Senkung der kardiovaskulären Mortalität resultiert. [10, 61]

Demgegenüber stehen multiple atherosklerose-hemmende Faktoren in der Gefäßwand. In der Gruppe dieser Faktoren spielen die nukleären Hormonrezeptoren der PPARs eine wichtige pathophysiologische und klinische Rolle. [62] Aktiviert durch endogene Liganden supprimieren PPARs pro-atherosklerotische Abläufe in der Gefäßwand. Eine zusätzliche Aktivierung wird durch exogene, synthetische Liganden erreicht, welche in der Therapie metabolischer Erkrankungen bereits klinisch eingesetzt werden. Zwei PPAR Isoformen sind in der Gefäßwand überwiegend exprimiert, PPAR α und PPAR γ . [62] Beide Isoformen vermitteln anti-atherosklerotische Effekte durch die transkriptionelle Regulation unterschiedlicher Zielgene. Wir untersuchten die PPAR-vermittelte Regulation dieser Zielgene und damit zusammenhängende Funktionen in Monozyten und in VSMC. Die Vorbehandlung mit PPAR α und PPAR γ Liganden resultiert in einer signifikanten Reduktion der MCP-1-induzierten Monozytenmigration. [21] Die anti-migratorische Aktivität von PPAR γ wird durch die Blockade der matrixdegradierenden MMPs vermittelt, wobei PPAR α eher direkt chemotaktische Funktionen in VSMCs beeinflusst. Einen potentiellen Mechanismus der anti-migratorischen Wirkungen von PPAR α Liganden konnten wir in VSMC charakterisieren. In diesen Zellen hemmen PPAR α Aktivatoren die TGF- β -induzierte-Expression der β 5-Integrine, welche für die VSMC Migration erforderlich sind. [20] Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir parallel einen neuen molekularen Mechanismus PPAR α -vermittelter Gensuppression identifizieren. Nach Ligandaktivierung von PPAR α kommt es zur Interaktion mit dem Smad 4 Transkriptionsfaktor, der zur Gruppe der TGF- β -regulierten Transkriptionsfaktoren gehört. Diese Interaktion blockiert die Transkription des β 5-Integrins. Die Hemmung der Migration vaskulärer Zellen durch PPAR-Aktivatoren wird durch die anti-proliferativen Effekte dieser Rezeptoren ergänzt. [49] In weiterführenden Studien zeigten wir, dass die anti-proliferative Wirkung von PPAR γ auf der Ebene des Zellzyklus vermittelt wird. PPAR γ Liganden hemmen die mitogen-induzierte Zellzyklusprogression durch Blockade der Rb-Phosphorylierung. [22] Durch die Regulation sogenannter cyclin-abhängiger Kinaseinhibitoren inhibieren PPAR γ Aktivatoren die Kinaseaktivität zentraler G1-Phase

Enzyme resultierend in der Hypophosphorylierung des Rb Proteins. Die Inhibierung des cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{Cip1} durch PPARs wird auf posttranskriptioneller Ebene vermittelt. [52] Durch die Aktivitätssteigerung spezifischer Phosphatasen nach PPAR γ Aktivierung kommt es zur Dephosphorylierung und Deaktivierung der PKC δ Isoform. Diese Deaktivierung führt dann zur Suppression von p21^{Cip1}. Mit diesen Studien identifizierten wir zentrale molekulare Wirkmechanismen, welche den anti-atherosklerotischen Wirkungen von PPAR γ -Liganden zugrundeliegen.

Die beschriebenen anti-atherosklerotischen in-vitro Effekte der PPAR Aktivatoren konnten wir für PPAR γ in einem Atherosklerose-Tiermodell in-vivo bestätigen. Die Behandlung mit Troglitazon hemmt signifikant die Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen unabhängig von der Beeinflussung metabolischer Parameter. [57] Im weiteren bestätigte sich die Wichtigkeit der anti-migratorischen Wirkung von PPAR γ Liganden auf Monozyten, da es unter Troglitazonbehandlung zu einer deutlichen Suppression der Makrophagenakkumulation in den Läsionen kommt.

Zur Klärung ob beide Systeme direkt miteinander interagieren und ob diese Interaktion Auswirkungen auf die Funktion der Systeme während der Atherogenese hat verwendeten wir ein atherosklerotisches Tiermodell, in dem die Entwicklung der Atherosklerose überwiegend durch Angiotensin II vermittelt wird. In diesen Angiotensin II-infundierten LDL-R-defizienten Mäusen hemmt Rosiglitazon deutlich die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. [25] Diese Daten bestätigen das Vorhandensein direkter Interaktionen zwischen Angiotensin II und PPAR γ . PPAR α Liganden inhibieren ebenfalls pro-atherosklerotische Angiotensin II Effekte in-vivo. So blockiert der PPAR α Aktivator Docosahexanoic Acid oxidative und inflammatorische Angiotensin II Wirkungen in Angiotensin II-infundierten Ratten. [58] Diese Interaktionen in-vivo werden durch eine Reihe von in-vitro Studien bestätigt. PPAR α und PPAR γ Aktivatoren inhibieren die Angiotensin II-induzierte Expression des Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Gens in VSMC. [63] Die Inhibierung von Cox-2 führte zur Blockade der Angiotensin II-stimulierten Migration und DNA-Synthese in VSMC. Zusätzlich hemmen PPAR γ Liganden die Aktivierung der MAPK-ERK1/2, ein zentraler Signaltransduktionsweg im Rahmen Angiotensin II-vermittelter Wirkung in vaskulären Zellen. [24] Ein zugrundeliegender molekularer Mechanismus dieser Interaktion lässt sich bei genauer Analyse der untersuchten Zielgene erkennen. Angiotensin II vermittelt seine pro-atherosklerotischen Effekte über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und Egr-1. [25, 64, 65] Es konnte gezeigt werden, das PPAR α direkt mit NF κ B und AP-1 Komponenten interagiert und dadurch die folgende Gentranskription blockiert. [66] PPAR γ Liganden hemmen die Expression von Egr-1 durch Interaktion mit einem Serum response Element im Egr-1 Promotor. [25] Die Deaktivierung Angiotensin II-stimulierter Transkriptionsfaktoren durch PPARs könnte die molekulare Grundlage für die beobachteten Wechselwirkungen sein. Die inhibitorischen Wirkungen der PPARs auf Angiotensin II-vermittelte Genstimulation, scheinen durch die entgegengesetzte Regulation von PPARs durch Angiotensin II ergänzt zu werden. Die Infusion von Angiotensin II in Apolipoprotein E-defiziente Mäuse reduzierte signifikant die vaskuläre Expression von PPAR α und PPAR γ , bei gleichzeitiger Induktion pro-atherosklerotischer Zielgene (MCP-1, E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, Cox-2). [67] Es ist somit anzunehmen, dass ein Teil der pro-atherosklerotischen Angiotensin II Wirkung aus der Reduktion einer endogen vorhandenen, anti-atherosklerotischen PPAR Aktivität resultiert. Zusammenfassend bestehen multiple bidirektionale Interaktionen zwischen Angiotensin II und PPARs, welche einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung und Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen haben.

Aus den beschriebenen Interaktionen lassen sich auch klinisch therapeutische Konsequenzen für die Zukunft ableiten. Inhibitoren Angiotensin II-vermittelter Effekte, wie ACE-Hemmer oder AT1-R Antagonisten, werden seit Jahren in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen verwendet. Gleichzeitig werden kardiovaskuläre

Hochrisikopatienten häufig mit PPAR Aktivatoren behandelt. Vor dem Hintergrund der bestehenden Wechselwirkungen dieser beiden Systeme könnte durch den Einsatz von z.B. AT1-R Antagonisten in Kombination mit Glitazonen synergistische Effekte induziert werden. Diese Synergismen würden nicht nur metabolische Parameter verbessern, sondern auch anti-atherosklerotische Wirkungen der Pharmaka in der Gefäßwand potenzieren. Hierdurch könnten neue spezifische Therapiekonzepte für kardiovaskuläre Risikopatienten entstehen.

Literaturverzeichnis

- [1] Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med* 340 [2], Seite 115-26.
- [2] Bevilacqua, M. P.; Nelson, R. M.; Mannori, G. und Cecconi, O. (1994): Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease, *Annu Rev Med* 45, Seite 361-78.
- [3] Adams, D. H. und Shaw, S. (1994): Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration, *Lancet* 343 [8901], Seite 831-6.
- [4] Gerrity, R. G. und Antonov, A. S. (1997): The pathogenesis of atherosclerosis, *Diabetologia* 40 [Suppl 2], Seite S108-10.
- [5] Schwartz, S. M. (1997): Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis, *J Clin Invest* 100 [11 Suppl], Seite S87-9.
- [6] Berk, B. C.; Haendeler, J. und Sottile, J. (2000): Angiotensin II, atherosclerosis, and aortic aneurysms, *J Clin Invest* 105 [11], Seite 1525-6.
- [7] Diet, F.; Pratt, R. E.; Berry, G. J.; Momose, N.; Gibbons, G. H. und Dzau, V. J. (1996): Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease, *Circulation* 94 [11], Seite 2756-67.
- [8] de Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W. und Unger, T. (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors, *Pharmacol Rev* 52 [3], Seite 415-72.
- [9] Schieffer, B.; Schieffer, E.; Hilfiker-Kleiner, D.; Hilfiker, A.; Kovanen, P. T.; Kaartinen, M.; Nussberger, J.; Harringer, W. und Drexler, H. (2000): Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability, *Circulation* 101 [12], Seite 1372-8.
- [10] Yusuf, S.; Sleight, P.; Pogue, J.; Bosch, J.; Davies, R. und Dagenais, G. (2000): Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, *N Engl J Med* 342 [3], Seite 145-53.
- [11] Chobanian, A. V.; Haudenschild, C. C.; Nickerson, C. und Drago, R. (1990): Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, *Hypertension* 15 [3], Seite 327-31.
- [12] Hayek, T.; Attias, J.; Coleman, R.; Brodsky, S.; Smith, J.; Breslow, J. L. und Keidar, S. (1999): The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice, *Cardiovasc Res* 44 [3], Seite 579-87.
- [13] Daugherty, A.; Manning, M. W. und Cassis, L. A. (2000): Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice, *J Clin Invest* 105 [11], Seite 1605-12.
- [14] Kintscher, U.; Wakino, S.; Kim, S.; Fleck, E.; Hsueh, W.A. und Law, R.E. (2001): Angiotensin II induces migration and pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes, *Hypertension* 37 [1 Pt 2], Seite 587-93.
- [15] Kintscher, U.; Bruemmer, D.; Blaschke, F.; Unger, T. und Law, R. E. (2003): p38

- MAP kinase negatively regulates angiotensin II-mediated effects on cell cycle molecules in human coronary smooth muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun* 305 [3], Seite 552-6.
- [16] Barbier, O.; Torra, I. P.; Duguay, Y.; Blanquart, C.; Fruchart, J. C.; Glineur, C. und Staels, B. (2002): Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 [5], Seite 717-26.
- [17] Forman, B. M.; Chen, J. und Evans, R. M. (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [9], Seite 4312-7.
- [18] Kliewer, S. A.; Lenhard, J. M.; Willson, T. M.; Patel, I.; Morris, D. C. und Lehmann, J. M. (1995): A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *Cell* 83 [5], Seite 813-9.
- [19] Desvergne, B. und Wahli, W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr Rev* 20 [5], Seite 649-88.
- [20] Kintscher, U.; Lyon, C.; Wakino, S.; Bruemmer, D.; Feng, X.; Goetze, S.; Graf, K.; Moustakas, A.; Staels, B.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (2002): PPARalpha inhibits TGF-beta-induced beta5 integrin transcription in vascular smooth muscle cells by interacting with Smad4, *Circ Res* 91 [11], Seite e35-44.
- [21] Kintscher, U.; Goetze, S.; Wakino, S.; Kim, S.; Nagpal, S.; Chandraratna, R. A.; Graf, K.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes, *Eur J Pharmacol* 401 [3], Seite 259-70.
- [22] Wakino, S.; Kintscher, U.; Kim, S.; Yin, F.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* 275 [29], Seite 22435-41.
- [23] Takeda, K.; Ichiki, T.; Tokunou, T.; Funakoshi, Y.; Iino, N.; Hirano, K.; Kanaide, H. und Takeshita, A. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells, *Circulation* 102 [15], Seite 1834-9.
- [24] Goetze, S.; Xi, X. P.; Graf, K.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (1999): Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett* 452 [3], Seite 277-82.
- [25] Wakino, S.; Collins, A.R.; Kintscher, U.; Kim, S.; Noh, G.; Moller, D.E.; Hsueh, W.A. und Law, R.E. (2001): PPARgamma Ligands Inhibit Angiotensin II-Induced Egr-1 Expression In Vivo and In Vitro, *Circulation* Vol. 104 (Abstract Supplement).
- [26] Unger, T. (2002): The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease, *Am J Cardiol* 89 [2A], Seite 3A-9A; discussion 10A.
- [27] Pastore, L.; Tessitore, A.; Martinotti, S.; Toniato, E.; Alesse, E.; Bravi, M. C.; Ferri, C.; Desideri, G.; Gulino, A. und Santucci, A. (1999): Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo, *Circulation* 100 [15], Seite 1646-52.

- [28] Pueyo, M. E.; Gonzalez, W.; Nicoletti, A.; Savoie, F.; Arnal, J. F. und Michel, J. B. (2000): Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 [3], Seite 645-51.
- [29] Grafe, M.; Auch-Schwelk, W.; Zakrzewicz, A.; Regitz-Zagrosek, V.; Bartsch, P.; Graf, K.; Loebe, M.; Gaehtgens, P. und Fleck, E. (1997): Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin, *Circ Res* 81 [5], Seite 804-11.
- [30] Chen, X. L.; Tummala, P. E.; Olbrych, M. T.; Alexander, R. W. und Medford, R. M. (1998): Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 83 [9], Seite 952-9.
- [31] Okamura, A.; Rakugi, H.; Ohishi, M.; Yanagitani, Y.; Takiuchi, S.; Moriguchi, K.; Fennessy, P. A.; Higaki, J. und Ogihara, T. (1999): Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages, *J Hypertens* 17 [4], Seite 537-45.
- [32] Dorffel, Y.; Latsch, C.; Stuhlmüller, B.; Schreiber, S.; Scholze, S.; Burmester, G. R. und Scholze, J. (1999): Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension, *Hypertension* 34 [1], Seite 113-7.
- [33] Hahn, A. W.; Jonas, U.; Buhler, F. R. und Resink, T. J. (1994): Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II, *FEBS Lett* 347 [2-3], Seite 178-80.
- [34] Scheidegger, K. J.; Butler, S. und Witztum, J. L. (1997): Angiotensin II increases macrophage-mediated modification of low density lipoprotein via a lipoxygenase-dependent pathway, *J Biol Chem* 272 [34], Seite 21609-15.
- [35] Braun-Dullaeus, R. C.; Mann, M. J.; Ziegler, A.; von der Leyen, H. E. und Dzau, V. J. (1999): A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* 104 [6], Seite 815-23.
- [36] Braun-Dullaeus, R. C.; Mann, M. J. und Dzau, V. J. (1998): Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease, *Circulation* 98 [1], Seite 82-9.
- [37] Sherr, C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue, *Cell* 79 [4], Seite 551-5.
- [38] Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell* 81 [3], Seite 323-30.
- [39] Nevins, J. R.; Leone, G.; DeGregori, J. und Jakoi, L. (1997): Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control, *J Cell Physiol* 173 [2], Seite 233-6.
- [40] Watanabe, G.; Lee, R. J.; Albanese, C.; Rainey, W. E.; Battle, D. und Pestell, R. G. (1996): Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity, *J Biol Chem* 271 [37], Seite 22570-7.
- [41] Kanasaki, H.; Fukunaga, K.; Takahashi, K.; Miyazaki, K. und Miyamoto, E. (2000): Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH3 cells, *Biol Reprod* 62 [6], Seite 1486-94.
- [42] Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S. K.; Gerard, C.; Sukhova, G. K.; Libby, P. und Rollins, B. J. (1998): Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Mol Cell* 2 [2], Seite 275-81.

- [43] Watanabe, H.; Nakanishi, I.; Yamashita, K.; Hayakawa, T. und Okada, Y. (1993): Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion, *J Cell Sci* 104 [Pt 4], Seite 991-9.
- [44] Westermarck, J. und Kahari, V. M. (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion, *Faseb J* 13 [8], Seite 781-92.
- [45] Galis, Z. S.; Sukhova, G. K.; Lark, M. W. und Libby, P. (1994): Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques, *J Clin Invest* 94 [6], Seite 2493-503.
- [46] Ricote, M.; Huang, J.; Fajas, L.; Li, A.; Welch, J.; Najib, J.; Witztum, J. L.; Auwerx, J.; Palinski, W. und Glass, C. K. (1998): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [13], Seite 7614-9.
- [47] Kintscher, U.; Wakino, S.; Bruemmer, D.; Goetze, S.; Graf, K.; Hsueh, W. und Law, R. (2002): TGF-beta(1) induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 expression in human THP-1 monocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 297 [4], Seite 794.
- [48] Tontonoz, P.; Hu, E.; Graves, R. A.; Budavari, A. I. und Spiegelman, B. M. (1994): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer, *Genes Dev* 8 [10], Seite 1224-34.
- [49] Law, R. E.; Meehan, W. P.; Xi, X. P.; Graf, K.; Wuthrich, D. A.; Coats, W.; Faxon, D. und Hsueh, W. A. (1996): Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia, *J Clin Invest* 98 [8], Seite 1897-905 02115.
- [50] Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation, *Nature* 374 [6518], Seite 131-4.
- [51] Weiss, R. H.; Joo, A. und Randour, C. (2000): p21(Waf1/Cip1) is an assembly factor required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation, *J Biol Chem* 275 [14], Seite 10285-90.
- [52] Wakino, S.; Kintscher, U.; Liu, Z.; Kim, S.; Yin, F.; Ohba, M.; Kuroki, T.; Schonthal, A. H.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (2001): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit mitogenic induction of p21(Cip1) by modulating the protein kinase Cdelta pathway in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem* 276 [50], Seite 47650-7.
- [53] Zezula, J.; Sexl, V.; Hutter, C.; Karel, A.; Schutz, W. und Freissmuth, M. (1997): The cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1 mediates the growth inhibitory effect of phorbol esters in human venous endothelial cells, *J Biol Chem* 272 [47], Seite 29967-74.
- [54] Goetze, S.; Xi, X. P.; Kawano, H.; Gotlibowski, T.; Fleck, E.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (1999): PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells, *J Cardiovasc Pharmacol* 33 [5], Seite 798-806.
- [55] Corjay, M. H.; Diamond, S. M.; Schlingmann, K. L.; Gibbs, S. K.; Stoltenborg, J. K. und Racanelli, A. L. (1999): alphavbeta3, alphavbeta5, and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation, *J Cell Biochem* 75 [3], Seite 492-504.

- [56] Smith, J. W.; Vestal, D. J.; Irwin, S. V.; Burke, T. A. und Cheresch, D. A. (1990): Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin, *J Biol Chem* 265 [19], Seite 11008-13.
- [57] Collins, A. R.; Meehan, W. P.; Kintscher, U.; Jackson, S.; Wakino, S.; Noh, G.; Palinski, W.; Hsueh, W. A. und Law, R. E. (2001): Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 [3], Seite 365-71.
- [58] Diep, Q. N.; Amiri, F.; Touyz, R. M.; Cohn, J. S.; Endemann, D.; Neves, M. F. und Schiffrin, E. L. (2002): PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation, *Hypertension* 40 [6], Seite 866-71.
- [59] Diep, Q. N.; El Mabrouk, M.; Cohn, J. S.; Endemann, D.; Amiri, F.; Virdis, A.; Neves, M. F. und Schiffrin, E. L. (2002): Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Circulation* 105 [19], Seite 2296-302.
- [60] Brasier, A. R.; Recinos, A., 3rd und Eledrisi, M. S. (2002): Vascular inflammation and the renin-angiotensin system, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 [8], Seite 1257-66.
- [61] Dahlof, B.; Devereux, R. B.; Kjeldsen, S. E.; Julius, S.; Beevers, G.; Faire, U.; Fyhrquist, F.; Ibsen, H.; Kristiansson, K.; Lederballe-Pedersen, O.; Lindholm, L. H.; Nieminen, M. S.; Omvik, P.; Oparil, S. und Wedel, H. (2002): Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol, *Lancet* 359 [9311], Seite 995-1003.
- [62] Neve, B. P.; Fruchart, J. C. und Staels, B. (2000): Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis, *Biochem Pharmacol* 60 [8], Seite 1245-50.
- [63] Hu, Z. W.; Kerb, R.; Shi, X. Y.; Wei-Lavery, T. und Hoffman, B. B. (2002): Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells, *J Pharmacol Exp Ther* 303 [2], Seite 563-73.
- [64] Brasier, A. R.; Jamaluddin, M.; Han, Y.; Patterson, C. und Runge, M. S. (2000): Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor, *Mol Cell Biochem* 212 [1-2], Seite 155-69.
- [65] Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Ruperez, M.; Blanco, J. und Egido, J. (2001): Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors, *Am J Pathol* 158 [5], Seite 1743-56.
- [66] Delerive, P.; De Bosscher, K.; Besnard, S.; Vanden Berghe, W.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; Fruchart, J. C.; Tedgui, A.; Haegeman, G. und Staels, B. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1, *J Biol Chem* 274 [45], Seite 32048-54.
- [67] Tham, D. M.; Martin-McNulty, B.; Wang, Y. X.; Wilson, D. W.; Vergona, R.; Sullivan, M. E.; Dole, W. und Rutledge, J. C. (2002): Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs, *Physiol Genomics* 11 [1], Seite 21-30.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 14. Oktober 2003

Dr.med.Ulrich Kintscher

Danksagung

Der grösste Dank gilt meiner Frau Frederike, die mich in meinem wissenschaftlichen Streben immer unterstützt hat und mir bei schwierigen persönlichen Entscheidungen in diesem Zusammenhang wirklich immer den richtigen Rat gegeben hat. Vielen Dank Frederike.

Ich möchte mich bei meiner Tochter Oona und meinem Sohn Cedrik bedanken, die mich meistens geduldig haben arbeiten lassen.

Meinen Eltern Eva und Walter bin ich sehr dankbar, da ohne Sie dies Alles von Beginn an nicht möglich gewesen wäre.

Ohne die immer motivierenden Worte und fachlichen Ratschläge von Prof. Dr. Ronald E. Law wäre mein Forschungsaufenthalt in Los Angeles nicht derartig prägend für mein weiteres Leben gewesen. Ich bin ihm zu allerhöchstem Dank verpflichtet.

Meinem japanischen Kollegen Dr. Shu Wakino gilt grosser Dank für das Entwickeln und Durchführen gemeinsamer Studien. Dr. Dennis Brümmer bin ich sehr dankbar für den guten Kontakt zwischen Los Angeles und Berlin.

Meinen Freunden und Kollegen im Deutschen Herzzentrum Berlin, Herrn Dr. Philipp Stawowy, Herrn PD Dr. Stephan Goetze, Herrn Dr. Christian Butter und Herrn Dr. Florian Blaschke, bin ich besonders dankbar für die fruchtbaren klinischen und wissenschaftlichen Diskussionen und die andauernde Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eckart Fleck und PD Dr. Kristof Graf, die mir überhaupt erst die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten gaben. Bei PD Dr. Kristof Graf möchte ich mich für seine kontinuierliche Unterstützung und für sein grosses Verständnis für zurückliegende berufliche Entscheidungen bedanken.

Schliesslich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Unger bedanken, der mich in allen wissenschaftlichen Belangen tatkräftig unterstützt und mir bei inhaltlichen und organisatorischen Fragen immer zur Seite steht. Durch seinen unermüdlichen Einsatz entstand am Campus Charité-Mitte das neue Center for Cardiovascular Research, welches für mein zukünftiges wissenschaftliches Arbeiten auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung ein optimales Umfeld darstellt.